

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

TRAITEMENT DES TRYPANOSOMIASES

PAR LES
"COULEURS DE BENZIDINE"

PREMIÈRE PARTIE — ÉTUDE CHIMIQUE

PAR MM. M. NICOLLE ET F. MESNIL

Chefs de laboratoire à l'Institut Pasteur.

Ehrlich et Shiga¹ ont fait connaître, il y a deux ans, un médicament coloré, le Trypanroth, susceptible d'influencer favorablement les affections à trypanosomes et en particulier le Mal de caderas expérimental. Après nous être rendu compte de l'action, si curieuse, de ce médicament, nous avons eu la pensée de soumettre à une étude systématique la série de matières colorantes à laquelle il appartient, c'est-à-dire la série des couleurs dites de benzidine. Rappelons que celles-ci (Griess-Böttiger) sont constituées, dans leur forme la plus simple (disazoïques), par une molécule d'une base diazotée (benzidine ou homologue) — sorte de noyau — unie soit à deux molécules (identiques ou non) d'un phénol ou d'une amine aromatique, soit à une molécule d'un phénol et à une molécule d'une amine aromatique — chaînes latérales du disazoïque, si l'on veut. Il existe donc des dérivés symétriques et des dérivés asymétriques. Certaines couleurs de benzidine, qui contiennent une ou deux molécules d'amine, peuvent, après avoir été diazotées, engendrer à leur tour, par copulation avec les phénols et les amines, des composés trisazoïques et tétrakisisazoïques. Comme on le voit, la famille dont fait partie le Trypanroth comprend, en dehors de centaines de corps déjà connus et utilisés en teinture, un nombre illimité de représentants possibles. Il importait donc de s'orienter au plus vite, sous peine

1. *Berliner klin. Wochenschrift*, 28 mars et 4 avril 1904.

d'être bientôt arrêté par la complexité du sujet. Nous avons été assez heureux pour y réussir et pour apercevoir, dès le début de nos recherches, deux des principales conditions que devaient remplir les corps actifs : nature naphtalénique des chaînes latérales et présence, dans ces chaînes, d'au moins un NH_2 , avec au moins deux SO_3H . Notre plan était alors tout tracé. Commencer par les couleurs disazoïques symétriques ; étudier d'abord les chaînes benzéniques (vraisemblablement inactives), puis les chaînes naphtaléniques supposées sans action, et enfin les chaînes naphtaléniques préjugées actives. Examiner ensuite, tour à tour, les couleurs symétriques contenant « deux mauvaises chaînes », « deux bonnes chaînes », ou une bonne et une mauvaise chaîne. Expérimenter, en terminant, les dérivés trisazoïques et tétrakisisazoïques. Parallèlement à cette revue des chaînes latérales, il était indispensable d'en passer une autre, destinée à nous fixer sur la valeur des noyaux (bases diazotées).

Tel a été notre plan théorique. Pratiquement, il s'est trouvé subordonné à la division des couleurs en existantes et non existantes dans l'industrie. Pour obtenir les premières, nous nous sommes adressés aux principaux Établissements français et étrangers. Les Maisons françaises et plusieurs Maisons étrangères nous ont exprimé leur vif regret de ne pouvoir nous fournir les dérivés que nous désirions, ceux-ci n'étant point du ressort de leur fabrication. Les autres Établissements étrangers ont répondu très gracieusement à notre appel; aussi sommes-nous heureux d'adresser ici nos sincères remerciements aux Fabriques suivantes : *Badische Anilin und Soda-fabrik* (Ludwigshafen); *Basler Chemische Fabrik* (**B1.**, Bâle); *Durand Huguenin* (Bâle); *Kalle und C°* (**K.**, Biebrich-a-Rhein); *Kinzelberger und C°* (Prague); *Farbwerk Mühlheim, vorm. Leonhardt und C°* (**L.**, Mühlheim-a-Main); *Levinstein limited Crumpsall Vale Chemical Works* (**Lev.**, Blackley près Manchester); *K. Oehler* (**O.**, Offenbach-a-Main); *Farbwerke vorm. Meister, Lucius und Brüning* (**M.**, Höchst-a-Main); qui nous ont offert un grand nombre d'échantillons, en nous indiquant la constitution chimique correspondante. Il nous faut encore remercier, d'une façon toute spéciale, la *Manufacture Lyonnaise de Matières Colorantes* (**MLy.** — Concessionnaire des

brevets de la *Maison L. Cassella et Cie* de Francfort), qui a mis à notre disposition une collection très complète de matières colorantes; malheureusement, il lui a été impossible de nous communiquer la formule de la plupart de ces composés.

Quant à ce qui concerne les dérivés non existants dans l'industrie, l'*Actiengesellschaft für Anilinfabrikation* (**A.**, Berlin) a bien voulu nous en fabriquer quelques-uns et la *Gesellschaft für Chemische Industrie* (**Ba.**, Bâle) un plus grand nombre; ces deux Maisons nous ont également envoyé divers colorants tout préparés (avec les formules); nous tenons à leur rappeler combien nous avons été sensibles à leur obligeance.

Enfin, après nous avoir permis de puiser largement dans ses produits commerciaux et ses couleurs de collection, les *Farbenfabriken vorm. F. Bayer und C°* (**By.**, Elberfeld) ont consenti à entreprendre, avec nous, des recherches systématiques sur la « Chromothérapie » des Affections à trypanosomes. Nous n'oublierons pas l'accueil cordial que nous avons reçu l'an dernier à Elberfeld, l'intérêt porté à nos recherches par le professeur Dreser et l'empressement mis par le chimiste, bien connu, des *Farbenfabriken*, le docteur Heymann, à élaborer avec nous un plan d'études. Nous prions la Direction des *Farbenfabriken* d'accepter ici le témoignage de notre reconnaissance et nous considérons comme un agréable devoir d'associer le nom du docteur Heymann aux nôtres, dès les premières lignes de ce travail.

TRAITEMENT DU NAGANA EXPÉRIMENTAL DES SOURIS

Nous avons pris, pour point de départ de nos recherches, le traitement du Nagana expérimental des souris. Le choix de cette infection, comme test-objet, a été dicté par les raisons suivantes. La maladie évolue avec une telle régularité que l'on peut apprécier même une survie de moins de 24 heures, imputable à la médication. D'autre part, le Nagana représente peut-être la plus sévère des affections à trypanosomes, à coup sûr une des plus importantes. Enfin, le Trypanroth, si efficace dans le Mal de caderas expérimental des souris, l'est manifestement moins dans le Nagana, comme l'ont reconnu Ehrlich et Shiga d'abord, puis divers auteurs, ainsi que nous-mêmes. Chacune

de nos souris, pesant généralement 15 à 20 grammes, recevait (*une fois pour toutes*) sous la peau du dos, de quelques heures à un jour et demi après l'apparition des trypanosomes dans le sang, 1 c. c. d'une solution aqueuse à 1 0/0 de la couleur employée. Lorsque la couleur se montrait toxique à cette dose, on recommençait le traitement avec 1/2 ou 1/4 de centigramme. Ceci dit, nous allons faire connaître les résultats de nos études, en nous référant au plan esquisisé tout à l'heure. L'action thérapeutique *maxima*, exprimée en jours de retard sur les témoins, sera seule mentionnée et nous servira de guide dans nos comparaisons. *Il ne sera point question*, pour le moment, du traitement des rechutes. Enfin, nous indiquerons, à l'aide des abréviations usitées plus haut (en caractères gras), les noms des Maisons auxquelles nous devons chacun des dérivés appartenant aux groupes actifs; toutefois, lorsqu'il s'agira d'un même corps, fourni gracieusement par diverses Maisons, nous nous abstiendrons, naturellement, de citer la Fabrique d'où provient l'échantillon le plus efficace; aussi bien, les différences observées en pareille matière ont-elles été rarement considérables.

RECHERCHES AVEC LES DISAZOIQUES SYMÉTRIQUES

ÉTUDE DES CHAINES LATÉRALES

Chaines benzéniques.

Lorsqu'une base diazotée (du groupe de la benzidine) se trouve copulée avec un phénol ou une amine benzéniques, la couleur résultante ne manifeste aucune activité. Ainsi, le phénol, le phénétol, l'acide salicylique, la m.phénylène-diamine, la m.toluylène-diamine monosulfo..., unis à la benzidine (par abréviation, B.) ou à ses homologues [o.dianisidine (D.), o.tolidine (T)... p.diamidodiphénylurée, p.diamidostilbène disulfo...] engendrent des composés dénués de toute efficacité, alors même que le diazo employé fait partie des meilleures bases. Notons que la plupart de ces composés inefficaces ne teintent pas les animaux en expérience.

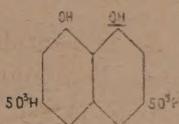
« Mauvaises chaînes » naphthaléniques.

Ce sont celles qui ne contiennent pas le groupe NH₂ ou qui, le contenant, n'offrent pas, d'autre part, au moins deux SO₃H.

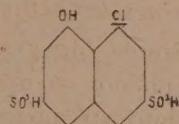
les couleurs correspondantes teintent, ou non, les souris. Les « mauvaises chaînes » naphtaléniques sont représentées (entre autres) par les trois classes suivantes de corps.

1^o *Naphtols et leurs dérivés sulfonés, dioxy naphtalènes et leurs dérivés sulfonés*, c'est-à-dire : β naphtol ; β naphtol monosulfo 2.6 (acide S de Schäffer). — Remarque générale : les dérivés sulfonés sont couramment désignés par le nom de l'acide correspondant, mais figurent, en réalité, dans la molécule colorante, sous la forme de sel alcalin, habituellement de sel sodique)... β naphtol disulfo 2.3.6 (ac. R)... β naphtol trisulfo 2.3.6.8... α naphtols monosulfo 1.4 (ac. de Néville et Winther), 1.5 (ac. de Clève)... dioxy naphtalène monosulfo 1.8.4 (ac. S), 2.5.7... dioxy naphtalène disulfo 1.8.3.6 (ac. chromotropique)..., combinés à diverses bases : B., D., T., éthoxybenzidine, dichlorobenzidine... m.azoxytoluidine, p.diamidostilbène disulfo...

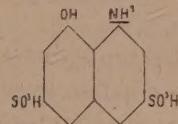
Comme exemple de chaîne naphtalénique ne contenant pas le groupe NH^2 , citons encore le chloroxynaphtalène disulfo 1.8.3.6, seul composé de sa famille que nous ayons étudié (avec T.). Il est intéressant de rapprocher ce dérivé, ainsi que l'acide chromotropique, inactifs l'un et l'autre, de deux composés amidés, « également 1.8.3.6 », l'ac. H et la naphtylène-diamine disulfo 1.8.3.6, actifs l'un et l'autre bien qu'à un degré très différent.



Dioxynaphthalène di-
sulfo 1.8.3.6. (Ac. chromotropique.)



Chloroxynaphthalène di-
sulfo 1.8.3.6.



Amidonaphtol disulfo
1.8.3.6 (Ac. H.)

2^o *Naphtylamines et leurs dérivés monosulfonés*, c'est-à-dire : α naphtylamine, α naphtylamines monosulfo 1.4 (ac. naphthionique), 1.5 (ac. L), 1.6... β naphtylamine et sa glycine, β naphtylamine phénylée, β naphtylamines monosulfo 2.7 (ac. Δ ou F), 2.5 (ac. D ou γ), 2.6 (ac. de Brönnner), ac. de Brönnner éthylé... combinées à : B., D., T., éthoxybenzidine, benzidine o-disulfo... benzidine sulfone o-disulfo... p.diamidodiphénylurée, m.azoxyaniline, diamidostilbène disulfo...

3^o *Amidonaphtols monosulfonés*. -- Nous en avons étudié

un certain nombre : 1.3.7, 2.3.6, 2.5.7 (ac. J), 1.8.6, 1.8.4 (ca. S), 2.8.6 (ac. G ou γ), le dérivé phényle de l'ac. G... combinés à B., D., T.. éthoxybenzidine, benzidine o.disulfo,... m.azoxy-aniline ; les couleurs ainsi constituées sont régulièrement inactives. L'acide G, comme tous les amidonaphhtols et leurs dérivés, peut se copuler aux diazos non seulement en milieu alcalin, mais encore en milieu acide (cf. plus loin ce qui concerne l'ac. H); dans le premier cas, l'azogroupe s'insère en position 7, dans le second en position 1; dans les deux cas, les produits obtenus ne jouissent d'aucun pouvoir thérapeutique.

« Bonnes chaînes » naphtaléniques.

Nous les avons rencontrées, avec une fréquence variable, soit parmi les *naphtylamines*, *amidonaphhtols* et *naphtylène-diamines disulfonées*, soit parmi les *naphtylamines trisulfonées*. Les *colorants*, engendrés par l'union de ces corps avec les bases benzidiniques, *teintent* presque toujours les animaux, *toujours lorsqu'ils sont actifs*.

1^o α *Naphtylamines disulfo*. — Beaucoup se sont montrées inefficaces : α naphtylamines disulfo 1.3.6 ou ac. α d'Alén (avec la B. et la T., **By.**), 1.4.6 ou ac. I de Dahl (avec la B. et la D., **By.**), 1.4.8 ou ac. δ ou S de Schöllkopf (avec la B., la D. et la T., **By.**), 1.6:8 (avec la B., la D. et la T., **By.**)...; d'autres très peu actives : α naphtylamines disulfo 1.3.7 ou ac. β d'Alén (12 heures de retard avec la B., rien avec la D., **By.**), 1.3.8 ou ac. ε (24 heures avec la B., **By.**), 1.4.7 ou ac. III de Dahl (24 heures avec la B., rien avec la D. et la T., **By.**)... Une seule a manifesté un pouvoir thérapeutique moyen, l' α naphtylamine disulfo 1.5.7 (14 jours 1/2 avec la B., rien avec la D., **By.**). Les α naphtylamines disulfo représentent les moins efficaces des « bonnes chaînes » ; la meilleure d'entre elles est évidemment le type 1.5.7 (avec la B.).

2^o β *Naphtylamines disulfo*. — La β naphtylamine disulfo 2.6.8 ou ac. G. ou γ n'a donné qu'un retard de 24 heures (avec la T., **By.**), mais il s'agissait d'une couleur assez peu soluble; la β naphtylamine disulfo 2.3.7 ou ac. δ a donné 36 heures avec la B. et rien avec la D. et la T. (**By.**); la β naphtylamine disulfo 2.5.7 a donné 5 jours avec la B. (**By.**), 12 heures avec la dichlorobenzidine (**Ba.**), rien avec la D. et la T. (**By.**). On

voit que les β naphtylamines disulfo se présentent mieux que les α naphtylamines correspondantes. Le type 2.3.6 ou ac. R va nous en fournir un exemple meilleur encore. C'est la « chaîne latérale » du Trypanroth d'Ehrlich et Shiga. Nous avons pu l'étudier copulée avec 9 bases diazotées diverses et voici les résultats de cette étude :

2 molécules d'acide R
+ 1 mol. de

Benzidine (M.): 0 (comme l'ont fait remarquer Ehrlich et Shiga, la couleur en question est assez peu soluble; suffisamment toutefois, d'après nous, pour manifester un pouvoir curatif net si elle en possédait).
Benzidine o.monosulfo (Ehrlich, M.) : ∞ (dans une seule expérience, il est vrai).
Benzidine o.disulfo (Ba.) : 1 jour.
Benzidine m.monosulfo (Ba.) : 0.
Benzidine m.disulfo (Ba.) : 0.
Dichlorobenzidine (A., Ba., L., Lev., O.) : 4 jours.
Tolidine (A., By., L.) : 8 jours.
Benzidine sulfone (Ba.) : 0.
Benzidine sulfone o.disulfo (Ba.) : 0.

La supériorité de l'acide R sur ses congénères n'est donc pas à discuter; mais, comme toutes les « bonnes chaînes », il se trouve influencé, dans son activité, par la nature de la base à laquelle on l'unit. Inefficace avec la B., les B. m.sulfo et disulfo, les B. sulfone et sulfone o.disulfo, il demeure médiocre avec la B. o.disulfo, s'améliore avec la dichlorobenzidine, encore plus avec la T., pour devenir bon avec la B. o.monosulfo.

3^e *Amidonaphtols disulfo*. — L'amidonaphtol disulfo 2.8.3.6 ou ac. 2R n'a rien donné (avec la B., **A.**); l'amidonaphtol disulfo 1.5.2.7 a donné 24 heures de retard avec la B., rien avec la D. et T. (**By.**); l'amidonaphtol disulfo 2.3.6.8 a donné 24 heures (avec la B., **A.**); l'amidonaphtol disulfo 4.8.2.4 ou ac. S.S a donné 3 jours (avec la D., **A., Lev.**); l'amidonaphtol disulfo 2.5.1.7 a donné 5 jours avec la B. (**Ba., By.**), 3 jours 1/2 avec la m.azoxylaniline (**Ba.**), 3 jours 1/2 avec la D. (**By.**) et 24 heures avec la T. (**By.**); l'amidonaphtol disulfo 1.8.4.6 ou ac. K a donné 5 jours 1/2 avec la B. (**By., K.**) et 18 jours avec la T. (**By.**). Mais le meilleur de tous les amidonaphtols disulfo est, sans contredit, le type 1.8.3.6 ou *acide H*. Nous avons été assez heureux (grâce, surtout, à l'obligeance des *Farbenfabriken*) pour pouvoir expérimenter l'action des dérivés que cet acide forme avec 24 bases diazotées différentes (en réalité 27; nous parlerons, plus loin, des 3 dernières).

Nos expériences peuvent se résumer ainsi :

$2 \text{ mol. d'ac. H} + 1 \text{ mol. de}$	B. (Bl., By., Lev., M., MLy., 0.) : 7 j. 1/2.	D. (A., By., Lev., M., MLy., 0.) : 14 jours.	T. (By., Lev., MLy.) : ∞ .
	B. o.nitro (By.) : 2 j. 1/2.		T. o.nitro (By.) : 2 jours.
	B. o.dinitro (By.) : 12 h.		
	B. o.sulfo (By.) : 24 heures.		
	B. o.disulfo (By.) : 36 h.		
	B. m.disulfo (By.) : 42 h.		T. m.disulfo (By.) : 0.
	B. o.dichloro (By.) : ∞ .	D. o.dichloro (By.) : 10 j.	T. o.dichloro (By.) : 0.
	B. o.dibromo (By.) : 0.		
	B. o.tétrabromo (By.) : 0.		
	B. sulfone o.disulfo (By.) : 0.		
	p.Diamidodiphénylamine (By.) : 5 jours.		
	p.Diamidodiphénylamine m.sulfo (By.) : 6 jours.		
	p.Diamidodiphénylurée (By.) : 48 jours.		
	p.Diamidodiphénylthiouurée (By.) : 8 jours.		
	m.Diamidodiphénylurée (By.) : 12 heures.		
	m.Azoxyaniline (By.) : 12 heures.		
	p.Diamidostilbène m.disulfo (By.) : 12 heures.		
	p.Diamidophénylglycoléther (By.) : 11 jours.		

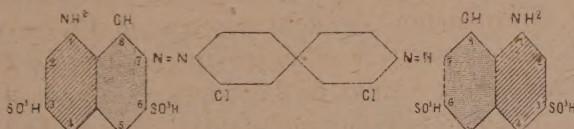
La nature des diazos auxquels on combine l'amidonaphtol disulfo 1.8.3.6 offre donc une grande importance: Si nous envisageons d'abord la triade classique : B., D., T., nous voyons que l'activité des composés, engendrés par leur union avec l.ac. H. croît de la B. à la T. Examinons, maintenant, l'influence de diverses substitutions dans la molécule de benzidine; nous trouverons que l'on augmente considérablement l'efficacité des couleurs par l'introduction de deux atomes de Cl, — qu'on la diminue beaucoup par celle d'un groupe o.nitro, de 2 groupes o.nitro, d'un groupe o.sulfo, de 2 groupes o.sulfo, de 2 groupes m.sulfo, — et qu'on la réduit à zéro quand il s'agit de 2 groupes o.bromo et, *a fortiori*, de 4 (dans ce dernier cas, les animaux ne sont même plus teintés; exemple unique, observé par nous, chez les dérivés de l.ac. H). Il est curieux de voir quel effet, diamétralement opposé, produisent les deux halogènes Cl et Br. La D. o dichlorée tombe au-dessous de la D.; la T. perd énormément quand on la transforme en T. o.nitro et n'engendre plus que des corps inactifs lorsqu'elle passe à l'état de T. o.dichloro ou m.disulfo. La benzidine sulfone o.disulfo ne vaut rien; la m.azoxyaniline et le p.diamidostilbène m.disulfo constituent des noyaux très médiocres; la p.diamidodiphénylamine et son dérivé m.sulfo valent beaucoup mieux; enfin, le p.diamidophénylglycoléther les dépasse notablement. La p.diamidodiphénylurée (sur laquelle nous

reviendrons) représente un diazo des plus intéressants; la substitution de CS à CO (c'est-à-dire de S à O), qui en fait la p.diamidodiphénylthiourée, abaisse fortement son activité; quant à la m.diamidodiphénylurée, elle se montre quasi inefficace.

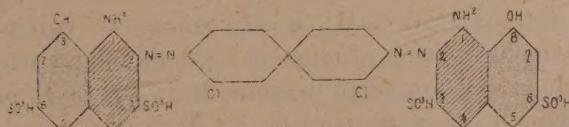
Les amidonaphtols disulfo peuvent s'unir aux diazos non seulement en milieu alcalin (comme dans les couleurs étudiées jusqu'ici), mais encore en milieu acide. Le mode d'insertion de l'azogroupe se trouve alors complètement interverti. Prenons par exemple l'ac. H, sur lequel l'azogroupe s'insère en position 7 (c'est-à-dire en ortho, par rapport à l'auxochrome OH), quand la copulation est réalisée en milieu alcalin. Si nous opérons en milieu acide, le chromophore N = N va venir se fixer en 2 (c'est-à-dire en ortho par rapport à l'auxochrome NH²). Dans le premier cas, l'amidonaphtol disulfo 1.8.3.6 « regarde » donc la base diazotée par son noyau α naphtol, dans le second, par son noyau α naphtylamine. Que va-t-il en résulter, au point de vue des propriétés thérapeutiques? Pour nous en faire une idée, nous avons comparé, entre eux, les deux composés suivants.

Dichlorobenzidine + ac. H cop. en milieu alcalin (**By.**).

Dichlorobenzidine + ac. H cop. en milieu acide (**By.**).



o. Dichlorobenzidine + ac. H. (Copulation en milieu alcalin.)



o. Dichlorobenzidine + ac. H. (Copulation en milieu acide.)

Le premier donne des solutions d'un bleu violet foncé, opaques même à la lumière; il colore fortement les animaux et peut les guérir à la suite d'une seule injection. Le second donne des solutions d'un violet rose, transparentes à la lumière; teinte faiblement les souris et n'a jamais déterminé de survie

excédant 5 jours. Inutile d'insister sur la conclusion qu'impose le parallèle précédent.

Grâce à ce fait que les bases benzidiniques diazotées ne fixent que successivement les deux chaînes latérales qu'on se propose de leur souder, avec un intervalle (nous allions dire une incubation) parfois notable, il est facile de produire, dans nombre de cas, des dérivés asymétriques (*ubi infra*) ; on sait tout le parti que l'industrie a tiré de cette curieuse propriété, aux allures quasi vitales. Parmi ces dérivés, les plus intéressants peut-être sont ceux que fournissent les copulations successives, en milieu acide et alcalin, d'un même amidonaphitol. Nous avons pu étudier, à ce point de vue, 5 couleurs, dans chacune desquelles une molécule de diazo avait été unie d'une part à une molécule d'ac. H copulée « acidiquement », d'autre part à une molécule d'ac. H copulée « basiquement » ; les résultats obtenus, mis en parallèle avec ceux que fournit l'ac. H combiné « basiquement-basiquement » aux mêmes noyaux, ne permettent, comme on va le voir, aucune conclusion nette. Nous attribuons ce fait à la difficulté d'obtenir, dans la plupart des cas, des dérivés « ac.-alc. » exempts d'un excès du composé « ac.-ac. » ou du composé « alc.-alc. ».

	Ac. H. alcalin-alcalin.	Ac. H. acide-alcalin.
Benzidine (By.).....	7 jours 1/2.	6 jours.
Dianisidine (By.).....	14 jours.	6 jours.
Tolidine (By.).....	∞	∞
p.Diamidotiphénylamine (By.)....	5 jours.	8 jours.
p.Diamidostilbène m.disulfo (By.).	1/2 jour.	1 jour.

Revenons à l'ac. H copulé en milieu alcalin et étudions maintenant l'influence des substitutions opérées dans le groupe NH² en remplaçant, par exemple, un H soit par le groupe CH²COOH (pour obtenir la glycine de l'ac. H), soit par le groupe COCH³ (pour engendrer un dérivé acétylé).

La glycine de l'ac. H a été expérimentée en combinaison avec 4 bases et voici ce que nous avons constaté :

2 mol. de glycine de l'ac. H + 1 mol. de	Benzidine (By.) : 8 jours. Dianisidine (By.) : 2 jours 1/2. Tolidine (By.) : 3 jours. p.Diamidotiphénylamine (By.) : 7 jours 1/2.

La glycine paraît donc supérieure à l'ac. H. vis-à-vis de la

p.diamidodiphénylanine et égale vis-à-vis de la B. ; elle lui reste certainement très inférieure en ce qui concerne la D. et la T.

Le dérivé acétylé de l'ac. H n'a manifesté aucun pouvoir thérapeutique ni avec la D., ni avec la dichlorobenzidine (**Ba.**).

4^o *Naphtylène-diamines disulfo.* — La naphtylène-diamine disulfo 1.8.3.6 s'est montrée inefficace avec la B. ; elle a donné 42 heures de retard avec la D. et 24 avec la T. La naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6 a permis des survies illimitées avec la B.

5^o *Naphtylamines trisulfo.* — Ainsi qu'on va le voir, celles que nous avons étudiées jusqu'ici n'ont pas donné de résultats très brillants. Les α naphtylamines trisulfo 1.4.6.8 et 1.3.5.7 n'agissent pas (avec la B., **By.**) ; l' α naphtylamine trisulfo 1.3.6.8 n'agit pas avec la B. et donne un jour de retard avec la dichlorobenzidine (**By.**, **Ba.**). La β naphtylamine trisulfo 2.3.6.8 n'agit pas (avec la B. et la T., **By.**) ; la β naphtylamine trisulfo 2.4.6.8 donne 12 heures de retard avec la T. (**By.**) ; la β naphtylamine trisulfo 2.3.6.7 n'agit pas avec la T. et la D. et donne 2 jours de retard avec la B. (**By.**). Il semble donc que si la présence de 2 sulfogroupes constitue pour les chaînes latérales un facteur d'efficacité indispensable, l'addition d'un troisième groupe SO_3^{H} offre plus d'inconvénients que d'avantages.

Conditions d'activité des chaînes latérales.

Les recherches précédentes peuvent se résumer ainsi : il existe des familles de corps dont tous les représentants constituent de « mauvaises chaînes » ; ce sont, d'une part, les noyaux benzéniques, d'autre part, les noyaux naphtaléniques qui ne possèdent point de groupe NH^{2} ou qui, en possédant, n'offrent pas, au moins, 2 groupes SO_3^{H} ; ces mauvaises chaînes, copulées avec *n'importe quelles bases* (y compris les meilleures), engendrent *toujours* des colorants inactifs. Il existe, d'autre part, des familles de corps dont certains représentants constituent des « chaînes parfaites », tandis que d'autres offrent une efficacité plus ou moins réduite, et que le reste demeure sans valeur aucune (naphtylamines, amidonaphthols et naphtylène-diamines disulfo ; naphtylamines trisulfo). A quoi peut-on attribuer les différences observées

dans ce dernier cas? Il faut, évidemment, faire la part de la base associée et nous montrerons plus loin la haute importance de ce facteur. Mais il faut aussi, pour commencer, faire la part des chaînes elles-mêmes, d'autant que certaines semblent dénuées d'activité avec toutes les bases possibles (du moins est-il permis de le supposer, quand on constate l'absence de pouvoir thérapeutique avec les trois termes du groupe B.. D.. T.. dont *les deux extrêmes* peuvent être si différemment influencés par les chaînes qu'on leur combine — *ubi infra*).

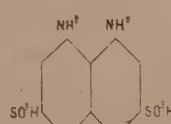
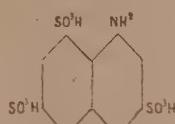
Faire la part des chaînes, c'est rechercher dans leur structure, par la méthode comparative, les raisons de leur efficacité, nulle, faible ou marquée. On conçoit immédiatement l'extrême complexité d'un tel problème. Pour en aborder l'étude avec quelque chance de succès, ne faudrait-il pas, en effet, posséder tout d'abord des centaines de disazoïques symétriques, dont la préparation à l'état pur, toujours très minutieuse et parfois très difficile, représenterait un labeur gigantesque et en partie stérile (car nous ne connaissons point encore le mode de formation de nombre des composants nécessaires à la synthèse de ces dérivés). Nous nous estimons heureux, pour le moment, du matériel que nous devons à l'obligeance de l'Industrie des matières colorantes et notamment des *Farbenfabriken*: il est assez varié et a coûté déjà beaucoup de travail et de soins. Grâce à lui, nous avons pu faire quelques observations intéressantes et ces observations conduiront sans difficulté, pensons-nous, à l'établissement de *lois partielles*, le jour où notre collection aura grandi.

Notre méthode comparative est basée sur le raisonnement suivant : Puisque les conditions indispensables pour la réalisation d'une « bonne chaîne » peuvent se réduire à la présence de deux groupes SO₂H et d'un groupe NH² (dans un noyau naphtalénique), les dérivés les plus simples, susceptibles de satisfaire à ces conditions, c'est-à-dire les *naphtylamines disulfo*, doivent être pris comme point de départ. On commencera par établir une série de familles d'après la position des 2 sulfogroupes fondamentaux. Puis, dans chaque famille, on tâchera de faire, successivement, la part : du groupe NH² fondamental (parallèle des α et β naphtylamines disulfo à groupes SO₂H identiques); d'un groupe SO₂H surajouté (passage aux

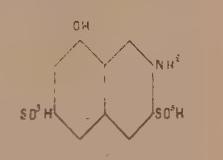
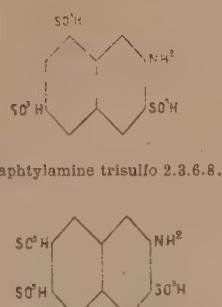
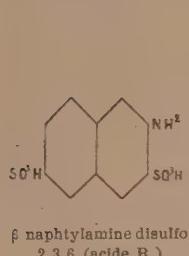
naphtylamines trisulfo); d'un groupe NH^2 surajouté (passage aux naphtylène-diamines disulfo); enfin, d'un groupe OH surajouté (passage aux amidonaphhtols disulfo).

Cette méthode est simple et logique; sans nous demander, quant à présent, quelles peuvent en être les limites, nous allons indiquer les résultats que nous lui devons.

Sulfogroupes fondamentaux 5. 7. — Ils réalisent certainement une position favorable, puisque l' α naphtylamine 1.3.7 constitue la meilleure chaîne de sa famille et que la β naphtylamine 2.3.7 possède une certaine activité; dans l'un et l'autre cas, cette activité ne se manifeste d'ailleurs qu'avec la B., (on en verra plus loin la raison).



α naphtylamine disulfo 1.3.6. α naphtylamine trisulfo 1.3.6.8. Naphtylène diamine disulfo 1.8.3.6



β naphtylamine disulfo 2.3.6 (acide B.)

β naphtylamine trisulfo 2.3.6.7. Naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6.

Sulfogroupes fondamentaux 3. 6. — On peut dire que l' α naphtylamine 1.3.6 est *virtuellement* active, tandis que la naphtylamine 2.3.6 l'est *réellement*. La première devient plus ou moins efficace par substitution des groupes SO^3H , NH^2 et OH à l'atome H n° 8 de la molécule; la seconde semble, au contraire, perdre son efficacité dans les mêmes conditions, tandis qu'elle devient active (*en combinaison avec la B.*), lorsque les substitutions intéressent l'atome H n° 7. Quelques

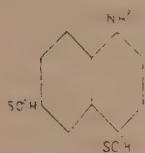
détails ne seront pas superflus. L' α naphtylamine 1.3.6 (inefficace par elle-même), transformée en α naphtylamine trisulfo 1.3.6.8 (cette transformation et toutes celles dont il sera question par la suite ne représentent, bien entendu, que des *transformations théoriques*, inspirées par la comparaison des diverses chaînes qui possèdent les mêmes groupes fondamentaux), manifeste un léger pouvoir curatif, tout au moins avec la dichlorobenzidine; transformée en naphtylène-diamine disulfo 1.3.6.8, elle montre encore cette faible propriété (avec la D. et la T.); enfin, transformée en amidonaphtol disulfo 1.3.6.8 (acide H), elle devient active au plus haut point. Mais elle le devient *d'autant plus que l'influence du groupe surajouté OH se fait sentir plus complètement*. Ce qui le prouve bien, c'est la différence de pouvoir thérapeutique, offerte par la couleur : « dichlorobenzidine + ac. H », selon que la copulation a été pratiquée en milieu alcalin ou en milieu acide. Dans le premier cas, le « noyau α naphtylamine » de la chaîne latérale tourne le dos au diazo (qu'on nous permette cette image triviale) et l'effet curatif peut être maximum; dans le second, il regarde au contraire le diazo, comme dans l' α naphtylamine trisulfo 1.3.6.8, et la supériorité sur cette dernière (qui se confond, évidemment ici, avec la supériorité du substituant OH sur le substituant SO³H) n'est plus que de 4 jours de survie.

La β naphtylamine 2.3.6 (efficace par elle-même), transformée en β naphtylamine trisulfo 2.3.6.8, baisse énormément d'activité (1/2 jour de survie avec la T., au lieu de 8 jours); transformée en amidonaphtol disulfo 2.8.3.6, nous ne pouvons savoir, d'après nos expériences, si elle flétrit (avec la B., la β naphtylamine disulfo 2.3.6 = 0 — avec la même B., l'amidonaphtol disulfo 2.8.3.6 = 0 pareillement), mais, en tout cas, elle ne gagne point. Elle paraît donc, comme nous le disions, se comporter à l'inverse de l' α naphtylamine disulfo 1.3.6 (dont elle ne diffère que par la situation du groupe NH² et, corrélativement, par le point d'insertion de l'azogroupe), quand l'II n° 8 de la chaîne vient à être substitué. Lorsque la substitution a lieu en 7, il en va autrement, ajoutons-nous: en effet, la β naphtylamine disulfo 2.3.6, transformée en β naphtylamine trisulfo 2.3.6.7, augmente d'activité avec la B. (tandis qu'elle devient inefficace avec la

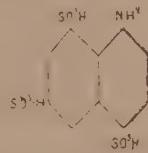
T.; on en verra plus loin la raison), et, transformée en naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6, elle acquiert des propriétés thérapeutiques très marquées (tout au moins avec la B.).

Sulfogroupes fondamentaux 6.8. — Ils représentent, sûrement, une mauvaise position, car l' α naphtylamine disulfo 1.6.8 se montre inefficace et le demeure quand on la transforme en α naphtylamine trisulfo 1.4.6.8 — et la β naphtylamine disulfo 2.6.8, très médiocre, ne gagne rien à devenir la β naphtylamine trisulfo 2.4.6.8, ou l'amidonaphtol disulfo 2.3.6.8 et perd son peu d'activité en passant à l'état de β naphtylamine trisulfo 2.3.6.8.

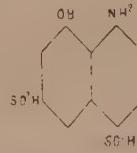
Sulfogroupes fondamentaux 3.7. — Ils sont peut-être un peu supérieurs aux précédents, car si l' α naphtylamine disulfo 1.3.7, très médiocre, devient inefficace quand on la transforme en α naphtylamine trisulfo 1.3.5.7 (on voit du même coup que l' α naphtylamine disulfo 1.5.7, que nous savons active, perd complètement ses propriétés thérapeutiques en subissant la transformation en α naphtylamine trisulfo 1.3.5.7) — par contre, la β naphtylamine disulfo 2.3.7, médiocre, gagne un peu en passant à l'état de β naphtylamine trisulfo 2.3.6.7 (mais, seulement, pour ce qui concerne sa combinaison avec la B.; — voir, toujours, *infra*).



α naphtylamine disulfo 1.4.6



α naphtylamine trisulfo 1.4.6.8



Amidonaphtol disulfo 1.8.4.6.

Sulfogroupe fondamental 4.6. (étudié, seulement, dans l' α naphtylamine disulfo 1.4.6). — L' α naphtylamine disulfo 1.4.6, pratiquement inefficace, est cependant virtuellement active. Si elle ne paraît pas le devenir par transformation en naphtylamine trisulfo 1.4.6.8, elle le devient, très fortement, par transformation en amidonaphtol disulfo 1.8.4.6 (acide K).

Il nous a été impossible d'appliquer notre méthode comparative aux groupes 4.8 (sans action, dans l' α naphtylamine

disulfo 1.4.8), 3.8 (très médiocre, dans l' α naphtylamine disulfo 1.3.8), 4.7 (très médiocre aussi, dans l' α naphtylamine disulfo 1.4.7), ... et 2.7 (très médiocre dans l'amidonaphtol disulfo 1.5.2.7), 2.4 (actif, avec la D., dans l'amidonaphtol disulfo 1.8.2.4), 1.7 (actif, avec plusieurs bases, dans l'amidonaphtol disulfo 2.5.1.7).

Si l'on a bien suivi notre exposé, malheureusement un peu aride, on pensera sans doute, avec nous, qu'il sera aisément à un moment donné, d'établir ce que nous nommions des lois partielles. De nouvelles couleurs en nombre relativement modéré, mais convenablement choisies, le permettraient peut-être assez rapidement.

Pour l'instant, nous conclurons que *les meilleures chaînes latérales sont celles qui contiennent — sous certaines conditions, dont les unes dépendent de la chaîne elle-même et les autres des bases associées — les sulfogroupes 5.7, 4.6 et surtout 3.6* (l'acide R, l'acide H et la naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6 ne sont-elles point incontestablement jusqu'ici nos meilleures chaînes?).

ÉTUDE DES BASES DIAZOTÉES

Le titre de notre travail indique implicitement que, seule, la famille de la benzidine (et homologues) est capable de fournir de « bonnes bases ». Les diazos benzéniques ou naphtaléniques ne sauraient convenir, en effet, même copulés avec les « meilleures chaînes »¹. Il est aisément démontré par des exemples typiques. Prenons d'abord les *monamines benzéniques*. Une molécule d'aniline diazotée, unie à une molécule d'acide K (K.), correspond pratiquement à la moitié de la couleur active : « B + ac. K »(K.). Pareillement, et sous une forme volontairement triviale, nous dirons que si l'on coupe en deux 1 molécule de la couleur : « T + ac. H », et si l'on ferme ensuite chacune des solutions de continuité avec un atome d'H, on obtiendra 2 molécules de la demi-couleur : « Toluidine diazotée + ac. H »(By). Or, les « demi-couleurs » « B + ac. K » et « T + ac. H », administrées aux souris, les teintent très vivement, il est vrai, mais d'une façon passagère et ne produisent aucun effet thérapeutique, même en réitérant les injections. Si donc

1. La *primuline* diazotée non plus.

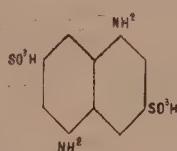
de tels dérivés, nés, pour ainsi dire, de la division symétrique de corps très actifs, demeurent absolument inefficaces, il n'y a certainement rien à attendre de tous les azoïques dont la base est fournie par une monamine benzénique. Rien, non plus, de ceux où le « noyau » est représenté par une *diamine benzénique*, ainsi que le prouve l'absence de tout pouvoir curatif du composé : « toluylène-diamine monosulfo 2.6.4 + 2 molécules d'ac. H » (**By**). Rien, encore, des couleurs obtenues en couplant les *bases naphtaléniques* avec les meilleures chaînes, comme dans le colorant inefficace : « naphtylène-diamine disulfo 1.5.3.7 + 2 molécules d'ac. H » (**By**).



o. Toluidine.



Toluylène-diamine monosulfo 2.6.4



Naphtylène-diamine 1.5.3.7.

Il faut donc recourir, de toute nécessité, aux *bases benzéniques*, c'est-à-dire aux *diamines aromatiques* dans lesquelles les deux hexagones (qui forment le squelette du composé) sont situés bout à bout (et non accolés latéralement, comme c'est le cas pour les bases naphtaléniques). Cette union bout à bout peut se faire soit directement (benzidine et ses dérivés mono-, bi-, poly-substitués), soit par l'intermédiaire d'un groupe (ou d'un atome) bivalent, de nature très variable (p.diamidodiphénylamine, p.diamidodiphénylurée, p.diamidostilbène, p.diamido-phénylglycoléther, m.azoxyaniline...). Dans l'un et l'autre cas, les couleurs engendrées par la combinaison de ces bases avec les *phénols* ou *amines aromatiques* jouissent très souvent de la *propriété substantive* (c'est-à-dire du pouvoir de teindre le coton sans mordant; dans l'un et l'autre cas, les couleurs engendrées par la combinaison de ces bases avec de *bonnes chaînes* jouissent très souvent de la faculté de détruire les trypanosomes *in vivo*). Cette faculté, qui obéit donc à des lois plus étroites que la faculté substantive, s'est rarement montrée absente dans nos expériences, mais, par contre, elle s'est

manifestée à des degrés très inégaux. Est-il possible d'en déterminer les raisons?

La chimie nous apprend qu'une des conditions essentielles de la substantivité réside en la position occupée par les deux groupes amidogènes diazotables. Si ces groupes sont situés en para, vis-à-vis de la liaison benzénique, les colorants formés ont les plus grandes chances de teindre directement les fibres végétales; si ces groupes sont situés en méta, les chances diminuent énormément; enfin, s'ils sont situés en ortho, elles disparaissent à l'ordinaire. Les différences observées par nous, au point de vue curatif, entre la p.diamidodiphénylurée et la m.diamidodiphénylurée sont absolument de même ordre. On nous fera sans doute remarquer le danger qu'il y aurait à trop généraliser, car la m.azoxyaniline, combinée à l'amidonaphthol disulfo 2. 5. 4. 7, n'a pas donné de trop mauvais résultats. Nous répondrons que, d'après les données classiques, cette base, quoique ayant ses amidogroupes en m., fournit — sans doute à cause de sa structure très spéciale — des dérivés parfaitement substantifs.

Envisageons, à présent, en elles-mêmes, les *deux classes de « noyaux » benzidiniques*, indiquées tout à l'heure.



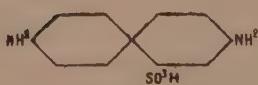
Benzidine



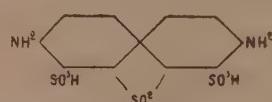
Benzidine diazotized.

Benzidine o-nitro (NO_2), sulfo (SO_3H)

Benzidine o-dimethylated (tolidine), dimethoxylated (dianisidine), dinitro-, disulfo-, dichloro-, dibromo-, etc.



Benzidine m-sulfo



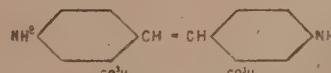
Benzidine sulfone o-disulfo.

D'une façon générale, la *benzidine* représente une bonne base. Qu'adviendra-t-il, si l'on remplace un ou plusieurs de ses

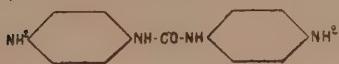
atomes d'H par des atomes ou des groupes monovalents? L'effet produit dépend, à la fois, de la *position* et de la *nature des éléments substituants*. La chimie enseigne que les substitutions en ortho, vis-à-vis de la liaison benzénique, diminuent ou suppriment la faculté de teindre directement le coton; exception faite pour le cas des groupes bivalents qui remplacent, en même temps (en ortho), un H de chacun des hexagones, par exemple le groupe sulfone (SO_2^+). Nos expériences ont toujours montré que les substitutions en ortho (par rapport à la liaison), y compris le cas de la benzidine-sulfone, engendraient des bases très mauvaises, voire inefficaces. Voilà pour la position des groupes substituants; quelle est maintenant l'influence de leur nature? Les groupes CH_3^+ et OCH_3^+ , que nous rencontrons (deux fois substituants en ortho) dans la tolidine et la dianisidine, ont une action généralement favorable. Nous reviendrons, plus loin, sur la triade B.. D.. T., couramment employée par l'industrie des couleurs directes; disons, dès à présent, que la D. offre constamment des propriétés intermédiaires à celles de la B. et de la T. L'influence des groupes o.nitro et o.dinitro paraît mauvaise, — celle des groupes o.disulfo (et, bien entendu, m.sulfo et m.disulfo) également — celle du groupe o.sulfo varie selon les chaînes associées — celle du groupe o.dichloro suivant les bases (ce groupe manifeste un véritable antagonisme vis-à-vis des groupes OCH_3^+ [D.] et surtout CH_3^+ [T.]), — enfin celle du groupe o.dibromo semble déplorable (inutile de parler du groupe o.tétrabromo).



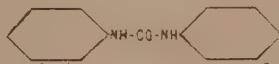
p. Diamido diphenylamine *m* sulfo.



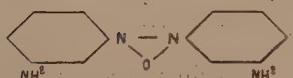
p. Diamidostilbene *m* disulfo.



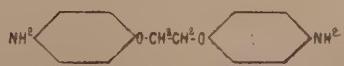
p. Diamido diphenylurée.



m. Diamido diphenylurée.



m. Azoxylaniline phény.



p. Diamidoglycoïthère.

Quant aux bases dans lesquelles les deux hexagones sont réunis par un groupe bivalent, elles paraissent, autant qu'on en peut juger d'après nos recherches, inférieures aux bases benzidiniques proprement dites. La meilleure semble être la diamidodiphénylurée; puis, viennent le diamidophénylglycoléther et la diamidodiphénylamine (dont un seul sulfogroupe en méta ne modifie point les propriétés d'une façon appréciable); quant au diamidostilbène m.disulfo, il se montre franchement mauvais (peut-être, en partie, à cause de la position de ses deux groupes SO_3H).

De même qu'il existe de bonnes et de mauvaises chaînes, il existe donc de bonnes et de mauvaises bases. Ces dernières, combinées aux meilleures chaînes, ne donnent jamais naissance qu'à des dérivés inactifs; nous pensons toutefois que le nombre des mauvaises bases doit être relativement restreint.

De même que la valeur d'une « bonne chaîne » dépend de la constitution chimique de celle-ci et de la nature des diazos avec lesquels on la combine, de même encore l'efficacité d'une « bonne base » se trouve liée et à la structure de cette base et à celle des chaînes qu'on lui adjoint. L'influence des bases sur les chaînes a été étudiée en détail dans ce chapitre; l'influence inverse peut-elle être élucidée à son tour? Malgré le nombre relativement limité de nos expériences, nous avons réussi à dépister l'une, au moins, des lois partielles qui régissent des rapports si obscurs en apparence. Cette loi concerne l'influence des sulfogroupes 6 et 7 des chaînes, sur la valeur comparée des bases qui forment : la triade classique (*B.*, *D.*, *T.*), — le couple *B.* et m.azoxylaniline, et le couple *B.* et dichlorobenzidine.

Nous ne serions pas étonnés que notre loi concernât, d'une façon générale, tous les « substituants » en 6 et 7, mais les éléments nous ont manqué jusqu'ici pour étudier cette question.

Triade B., D., T. — Toutes les fois que la chaîne (plus ou moins active) possède un groupe SO_3H en position 6, le pouvoir thérapeutique de la couleur engendrée croît de la *B.* vers la *T.* Exemples : la β naphthylamine disulfo 2.3.6; les amidonaphthols disulfo 1.8.4.6 et 1.8.3.6 (lorsque l'on remplace l'acide H par sa glycine, ce qui détruit l'intégrité du groupe NH_2 , la loi s'inter-

vertit, est-ce là un fait général?) ; la naphtylène-diamine 1.8.3.6.

Toutes les fois que la chaîne (plus ou moins active) possède un groupe SO_3^{H} en position 7, le pouvoir thérapeutique de la couleur croît de la T. vers la B. Exemples : les α naphtylamines disulfo 1.3.7, 1.4.7 et 1.5.7; les β naphtylamines disulfo 2.3.7, 2.5.7; les amidonaphtols disulfo 1.5.2.7 et 2.5.4.7.

Enfin, lorsqu'il y a présence simultanée d'un groupe SO_3^{H} en 7 et d'un SO_3^{H} en 6, c'est l'influence du premier qui semble prépondérante. Exemple : la β naphtylamine trisulfo 2.3.6.7.

Couple B. et m.azoxyaniline. — Avec l'amidonaphtol disulfo 1.8.3.6, la B. l'emporte sur la m.azoxyaniline; avec l'amidonaphtol disulfo 2.5.4.7, c'est le contraire.

Couple B. et dichlorobenzidine. — Avec la naphtylamine disulfo 2.5.7, la B. l'emporte sur la dichlorobenzidine; avec la β naphtylamine disulfo 2.3.6, la β naphtylamine trisulfo 1.3.6.8 et l'amidonaphtol disulfo 1.8.3.6, c'est le contraire.

Il est difficile de ne voir, dans ce qui précède, qu'un pur effet du hasard. Si donc, ainsi que nous l'admettons, cette loi doit être considérée comme l'expression de la vérité, on peut dire qu'elle prouve, par réciprocité et du même coup : l'exactitude des formules attribuées par les chimistes aux dérivés naphthaléniques en question, la pureté des colorants qu'on nous a gracieusement offerts, la valeur du Nagana choisi comme test-objet et la nécessité d'avoir été très minutieux dans l'expérimentation.

L'influence des chaines sur les bases se manifeste également dans l'activité, si différente, des deux couleurs « B. o.sulfo + ac. R » et « B. o.sulfo + ac. H », qui possèdent les deux mêmes sulfogroupes. On pressent toute une « hiérarchie » de lois, mais de nombreux matériaux d'étude seraient indispensables pour les établir.

Concluons que, s'il existe, incontestablement, de bonnes chaines et de bonnes bases, il ne suffit point d'associer n'importe quelle bonne chaîne à n'importe quelle bonne base pour voir naître, *ipso facto*, une bonne couleur. Il faut, avant tout, tenir compte de l'influence mutuelle des deux composants. Grâce aux observations que nous avons relatées ici, on pourra déjà s'orienter un peu dans le dédale des formules et l'on ne sera point tenté, par exemple, de réaliser la combinaison d'une

« bonne chaîne » à sulfo-groupe en 7, avec la « bonne base » tolidine.

PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES COULEURS ACTIVES

Changeons, maintenant, de point de vue et, prenant les couleurs actives *toutes formées*, comparons-les, entre elles et avec les disazoïques symétriques inefficaces, sous le rapport de leurs propriétés générales.

Couleur des solutions.

On admet que la couleur des dérivés de la benzidine est surtout liée à la masse et à la structure intime de leurs chaînes latérales.

Masse. — Les légères copules benzéniques donnent, ordinairement, des jaunes, des orangés, des bruns; les arborescences complexes des polyazoïques (*ubi infra*) engendrent d'habitude des bruns, des verts, des « noirs »; les noyaux naphtaléniques, intermédiaires, comme importance, aux deux types précédents, fournissent des rouges (et roses) ainsi que des bleus (et violets — nous laissons de côté, volontairement, ce qui concerne les nuances).

Structure intime. — Dans les chaînes isomères, la position des groupes NH₂, SO₃H, OH, commande la variété des tons. Comme nos bonnes chaînes appartiennent toutes aux noyaux naphtaléniques, *il en résulte, forcément*, que les couleurs actives correspondantes ne sauraient être que des rouges et des bleus. De fait, les dérivés des naphtylamines di et trisulfo et ceux des naphtylène-diamines disulfo sont *rouges*, — ceux des amidonaphtols disulfo *bleus* (on n'observe que de rares bruns et orangés dans les deux groupes). *Il en résulte, par contre*, qu'il existe beaucoup de rouges et de bleus inefficaces; ainsi, l' α naphtol monosulfo 1,4 (mauvaise chaîne) produit des bleus avec la D. et l'éthoxybenzidine, l'amidonaphtol monosulfo 1,5,7 (m. c.) des violets avec la triade B., D., T., l' α naphtylamine monosulfo 1,4 (m. c.) des rouges avec ces mêmes bases, etc... Les lois qui régissent la couleur des dérivés de la benzidine apparaissent donc comme moins étroites que celles d'où dépend le pouvoir thérapeutique de ces dérivés. La nature

des bases diazotées n'est pas toujours négligeable, en matière de couleur; ainsi l'acide H, qui fournit des bleus avec la triade B., D., T., donne un beau rose carmin avec la m. azoxyaniline. Enfin, les rapports qui unissent les chaînes et les bases ont également leur importance, mais cette question sort trop de notre sujet pour que nous y insistions.

Pouvoir colorant « in vivo ».

(Ou résistance de la couleur à l'action destructive de l'organisme.)

Nous avons vu qu'il fait le plus souvent défaut avec les chaînes benzéniques et, dans un certain nombre de cas, avec les mauvaises chaînes naphtaléniques. Comme mauvaises chaînes naphtaléniques, susceptibles de colorer les animaux, nous pouvons citer l'α naphtylamine monosulfo 1. 6 (avec la D. et la T.), le β naphtol trisulfo 2.3.6.8 (avec la dichlorobenzidine), le dioxynaphtalène disulfo 1.8.3.6 (avec la B., la D. et la T.), l'amidonaphtol monosulfo 1.8.4 (avec la D. et la T.). Quant aux chaînes qui appartiennent aux « bons groupes », elles jouissent toutes du pouvoir tinctorial, au moins avec certaines bases, et leurs dérivés actifs colorent toujours les souris, ainsi que nous le savons déjà. En résumé, les lois de la teinture *in vivo* se présentent comme moins étroites, elles aussi, que celles d'où dépend la propriété curative. Mais ces lois, qui visent les chaînes latérales, ne sont point seules à considérer. Les bases ont également leur importance, qu'il s'agisse de dérivés efficaces ou non; ainsi, l'amidonaphtol monosulfo 2.8.6 (inactif) colore les animaux avec la B., o. disulfo et pas avec la B. ni l'éthoxybenzidine, l'acide H (actif) les colore avec un très grand nombre de bases, mais pas avec la B. tétrabromée. Il convient, enfin, de tenir compte de l'influence des chaînes sur les bases; la loi des sulfogroupes 6 et 7 paraît applicable ici, même avec les composés inactifs.

La teinture *in vivo* ne nous intéresse point uniquement par son intensité, mais encore et surtout par sa durée. Inutile de revenir sur l'action fugace des « demi-couleurs »; faisons simplement remarquer qu'avec nos bons dérivés de la benzidine les sujets demeurent teintés pendant longtemps et ne se décolorent que peu à peu, ce qui favorise, on le conçoit, l'action thérapeutique.

Substantivité.

(Ou pouvoir de teindre le coton non mordancé.)

Les auteurs ne s'entendent guère sur la cause de ce curieux pouvoir (rarement observé en dehors des dérivés de la benzidine). Les uns le rattachent uniquement à l'état physique (colloïdal) des couleurs. Les autres en cherchent l'explication dans la seule structure de ces mêmes couleurs et surtout dans celle de leurs bases diazotées (Wahl a fait voir qu'il fallait également tenir compte, à titre accessoire il est vrai, de la composition des chaînes latérales). Nous avouons ne pas comprendre pourquoi on s'efforce ainsi d'opposer, entre elles, les propriétés physiques et chimiques, au lieu de tenter de dépister les rapports qui les unissent certainement.

En tout cas, on ne saurait nier que la substantivité marche habituellement de pair avec diverses particularités constitutives des diazos. Nous avons déjà étudié ces particularités et notre étude a montré que bien des bases, susceptibles de fournir d'excellentes couleurs directes, n'engendraient, *avec les meilleures chaînes*, que des dérivés inefficaces ou tout au moins de médiocre valeur curative. Rappelons que si l'influence de la position du groupe NH_2 semble la même sur le pouvoir substantif et sur le pouvoir thérapeutique, l'influence de la position des groupes substituants, dans la B., se révèle au contraire plus grande sur le pouvoir thérapeutique que sur le pouvoir substantif, et celle de la nature de ces groupes encore plus considérable. Enfin, l'influence de la configuration générale des bases à hexagones séparés doit affecter, elle aussi, le pouvoir thérapeutique plus que le pouvoir substantif. Les lois qui régissent le premier sont donc plus strictes que celles qui commandent le second (comme pour ce qui concerne la couleur et le pouvoir colorant *in vivo*).

Pratiquement parlant, les dérivés non substantifs se sont toujours montrés inefficaces et les dérivés modérément substantifs n'ont jamais manifesté une activité marquée. Seule, la famille des dérivés bien substantifs a fourni de bons médicaments colorés; mais, répétons-le, elle en a fourni de médiocres et un très grand nombre de nuls, même avec les meilleures chaînes.

Transparence des solutions.

L'étude, si simple, de la transparence des solutions permet

de relier, dans une certaine mesure, l'état physique et la composition chimique des couleurs et de mettre ces deux éléments, réunis, en parallèle avec le pouvoir thérapeutique. Voici, à cet égard, ce que l'expérience nous a montré. Les couleurs *transparentes au jour* (en solution à 1 0, 0) sont généralement inactives; mais les couleurs *transparentes à la lumière* peuvent se montrer très bonnes. Toutefois, c'est parmi les couleurs *opaques* (en solution) que se rencontre la majorité des bons médicaments. Inutile d'ajouter que, par contre, une foule de couleurs opaques ne jouissent d'aucune vertu curative. Les chaînes, qui fournissent la presque totalité des solutions transparentes, sont les naphtylamines disulfo et trisulfo (joignons-y, également, la naphtylène-diamine disulfo 1.8.3.6). Les bases ont, naturellement, leur influence sur l'aspect des colorants dissous et cette influence devient frappante lorsqu'elle s'exerce vis-à-vis de chaînes qui engendrent presque constamment des couleurs *opaques* (e. s.); ainsi, l'acide H, combiné à la diamidodiphénylurée, fournit un dérivé transparent à la lumière, alors qu'avec la majorité des autres bases il donne naissance à des composés *opaques*.

Toxicité.

Les disazoïques symétriques sont ordinairement inoffensifs, à la dose de 1 centigramme, pour une souris de 15 à 20 grammes, ce qui représente une bien faible toxicité et, partant, un grand avantage au point de vue thérapeutique. Mais il en est, et des meilleurs, qui doivent être administrés à dose plus faible. D'une façon générale, les amidonaphthols disulfo se montrent moins dangereux que les naphtylamines (di et trisulfo) et naphtylène-diamines (disulfo), ce qui tient, évidemment, à l'introduction du groupe OH dans la molécule. Objectivement, cette différence se traduit par ce fait que les « bleus » sont plus faciles à manier que les « rouges ». Les bases diazotées ont un certain rôle dans la toxicité, même en matière de couleurs inactives: ainsi, le dérivé acétylé de l'acide H, inoffensif avec la D., ne l'est plus avec la dichlorobenzidine. Enfin, il y a lieu, naturellement, de tenir compte de l'influence des chaînes sur les bases; cette influence paraît régie, ici encore, par la loi des sulfogroupes 6 et 7, même quand il s'agit de dérivés inefficaces.

Il n'existe aucun rapport entre la toxicité et le pouvoir curatif; ainsi l' α naphtylamine disulfo 1.4.8 se montre toxique et sans valeur avec la T., l' α naphtylamine trisulfo 1.4.6.8, toxique et sans valeur avec la B..., alors que nous savons la majorité des couleurs actives bien supportées.

Voici, à titre de document, la dose thérapeutique de nos meilleures couleurs (pour des souris de 20 gr.).

o.Dichlorobenzidine + acide H (alcalin).....	1 centigramme.
o.Tolidine + acide H (alc.).....	1 —
p.Diamiodiphénylurée + ac. H (alc.).....	1 —
o.Tolidine + acide H (acide-alc.).....	1 —
o.Bianisidine + acide H (alc.).....	1 —
o.Tolidine + acide K (alc.).....	1 —
Benzidine + naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6.	0.75 —
Benzidine o.sulfo + ac. R (Trypanroth).....	0.50 —
B + α naphtylamine disulfo 1.5.7.....	0.50 —

(N. B. — Alc. = copulé en milieu alcalin; ac. = cop. en milieu acide. L'atoxyl, dont nous parlerons ultérieurement, s'administre aux mêmes doses que le Trypanroth.)

Le médicament coloré « par excellence » serait celui chez lequel le rapport de la dose toxique à la dose thérapeutique $(\frac{C}{T})$ se montrerait aussi éloigné que possible de l'unité. Nous verrons tout à l'heure que ce sont les colorants bleus qui s'éloignent le moins de cet idéal.

Conclusion.

Les dérivés actifs se présentent sous l'aspect de solutions bleues ou rouges, transparentes ou non à la lumière, colorant les animaux de façon durable, complètement inoffensives à dose thérapeutique et souvent à une dose supérieure — solutions jouissant, par ailleurs, du pouvoir de teindre directement les fibres végétales. Le premier groupe de propriétés est surtout lié à la structure des chaînes latérales; la dernière propriété, au contraire, dépend principalement de la configuration des bases diazotées. Nous pensons avoir établi nettement, au cours de cette étude, que la faculté curative est régie, à la fois, par l'un et l'autre de ces *facteurs morphologiques*.

Entre nos « bonnes couleurs » (lorsque nous employons cette expression abréviaitive, nous n'oubliions pas qu'Ehrlich,

en découvrant le Trypanroth, a été l'initiateur de toute cette étude) et les agents employés jusqu'ici pour le traitement des trypanosomiases (couleurs de la série du tryphénylméthane [Wendelstadt et M^{lle} Fellmer], sérums normaux [Laveran, Laveran et Mesnil], dérivés arsenicaux [Laveran et Mesnil, Thomas]), le parallèle chimique paraît des plus ardus. Nous croyons cependant qu'il y a quelque intérêt à le tenter.

Il est permis de penser que l'auxochrome NH^2 représente l'élément essentiel des chaînes latérales; toute cette architecture complexe des « bonnes couleurs » n'aurait alors comme effet que de mettre NH^2 dans les meilleures conditions possibles pour manifester son activité. L'un des H de l'auxochrome peut être substitué, dans certains cas (glycine de l'acide H), sans que cette activité disparaisse (il est vrai qu'elle fléchit avec deux bases sur trois). Or, les colorants qui ont donné des résultats positifs à Wendelstadt et M^{lle} Fellmer (violet de méthyle BB, bleu patenté VN, vert lumière, vert malachite et vert brillant!) contiennent, chacun, deux groupes NH^2 (le violet de méthyle en possède même un troisième). Ces deux groupes sont totalement substitués, il est vrai, mais cela ne saurait empêcher de les comparer avec nos groupes NH^2 ou NH (CH^2COOH). Quant à ce qui concerne les sérums normaux, ne renferment-ils pas des groupes NH^2 , supportés par des architectures autrement complexes que celles des matières colorantes?

Nous ne voudrions point que l'on considérât notre « théorie de l'amidogène » autrement que nous ne la considérons nous-mêmes, c'est-à-dire comme une pure « suggestion d'ensemble ». Cette suggestion trouve un nouvel appui dans les propriétés thérapeutiques d'un corps bien curieux, *l'oxychlorure de ruthénium ammoniacal*, découvert jadis par Jolly. Peu après sa découverte, l'un de nous en fit l'étude (avec Cantacuzène) au point de vue de ses propriétés tinctoriales et, lui reconnaissant tous les caractères des couleurs basiques, émit l'idée que « l'ammoniaque » devait être contenue, au sein de la molécule d'oxychlorure de ruthénium, sous la forme de groupes NH^2 . Or, voici que le composé de Jolly, inoculé aux souris naganées à la dose de 3 décimilligrammes, a pu retarder leur mort de 5 jours ; c'est peu au point de vue pratique, c'est beaucoup, pensons-nous, au point de vue théorique.

Passons aux composés arsenicaux. Si l'atoxyl, ou anilide métaarsénique $C_6H_5NH(AsO_2)$, appartient au même type structural que les médicaments étudiés jusqu'ici. l'acide arsénieux s'en écarte incontestablement. Toutefois, il est légitime de faire valoir ici les analogies, bien connues, qui existent entre les métalloïdes As et N (N représentant, en dernière analyse, le centre d'énergie de NH^2). Cette manière de voir n'a point seulement un intérêt théorique ; elle suggère aussi des recherches nouvelles avec Ph et Sb, qu'il faudrait offrir à l'économie sous leur forme la plus active (surtout pour Ph) et la moins toxique (surtout pour Sb).

Revenons aux 6 médicaments colorés que l'expérience nous a révélés comme les meilleurs et indiquons, en terminant, quelle est leur valeur respective. Les 3 suivants :

- o.Dichlorobenzidine + ac. H (alc.).
- o.Tolidine + ac. H (alc.).
- o.Tolidine + ac. H (ac.-alc.).

permettent, dans nombre de cas, de faire disparaître définitivement les trypanosomes, à la suite d'une seule injection de la dose curative. Ce résultat est obtenu moins souvent avec le dérivé :

Benzidine + naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6.
et exceptionnellement avec le :

Trypanroth (l'atoxyl ne se comporte pas beaucoup mieux).

Quant à la couleur :

p.Diamidodiphénylurée + ac. H (alc.).

elle est incapable de guérir les souris en une seule séance, mais elle a certainement mieux raison des *rechutes* que les 6 composés qui précédent.

RECHERCHES AVEC LES DISAZOIQUES ASYMÉTRIQUES

Ils ne se montrent jamais actifs, bien entendu, quand ils contiennent deux mauvaises chaînes. Lorsqu'une des chaînes est bonne et l'autre mauvaise, l'efficacité peut encore faire défaut. Par contre, dans le cas où les deux chaînes ont de la valeur, le pouvoir curatif apparaît constamment, semble-t-il.

RECHERCHES AVEC LES TRISAZOIQUES

Tous les dérivés de cette famille, même ceux qui renfer-

ment une bonne chaîne, sont absolument dénués de valeur thérapeutique. On ne saurait s'en étonner, si l'on songe que l'élément actif — souvent paralysé déjà, comme on vient de le voir, dans le cas des disazoïques asymétriques munis d'une bonne et d'une mauvaise chaînes — se trouve comme perdu, ici, au sein d'une molécule volumineuse où prédominent les groupements inefficaces.

Nous avons pu étudier, grâce à l'obligeance de la Manufacture Lyonnaise de Matières colorantes, un grand nombre d'azoïques complexes (*polyazoïques*), dont la constitution n'a pu, malheureusement, nous être communiquée dans la majorité des cas : aucune de ces couleurs n'a manifesté la moindre propriété curative.

TRAITEMENT DES TRYPANOSOMIASES EXPÉRIMENTALES AUTRES QUE LE NAGANA

Nous ferons connaître brièvement, pour terminer la partie chimique de notre travail, le résultat des essais thérapeutiques portant sur le Mal de caderas, le Surra et la Trypanosomiase humaine.

MAL DE CADERAS

Voici la liste des 13 couleurs étudiées à ce point de vue, avec l'activité *maxima* correspondante, exprimée, comme pour le Nagana, en jours de retard sur les témoins (souris) :

α Naphtylamine disulfo 1.5.7 + Benzidine.....	15 jours
β Naphtylamine disulfo 2.3.6 (ac. R) + B. (d'après Ehrlich et Shiga)...	2 jours
— — — B. o.monosulfo (Trypanroth)...	∞
— — — Dichlorobenzidine.....	2 jours
Amidonaphtol disulfo 1.8.3.6 (ac. H) + B. (alc.-alc.)	13 jours
— — — D. —	13 jours
— — — T. —	∞
— — — T. (ac.-alc.)	∞
— — — Dichlorobenzidine (alc.-alc.)	∞
— — — Dichlorobenzidine (ac.-ac.)	5 j. 1/2
— — — p. Diamidodiphénylurée (alc.-alc.).	14 jours
Amidonaphtol disulfo 4.8.4.6 (ac. K) + T.....	7 jours
Naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6. + B.....	∞

Il ressort des lignes précédentes que, parmi ces 13 couleurs, il en est 5 qui l'emportent manifestement sur les autres. Quelle est, maintenant, leur valeur respective?

Les deux suivantes :

Dichlorobenzidine + ac. H (alc.-alc.),

Benzidine o.monosulfo + ac. R (Trypanroth).

permettent, dans bien des cas, de débarrasser définitivement l'organisme des trypanosomes, après une seule intervention, tandis que ce résultat ne s'obtient qu'exceptionnellement avec les 3 autres. Il est vrai que cette infériorité se trouve compensée, jusqu'à un certain point, pour le dérivé « naphthylène-diamine disulfo 2. 7. 3. 6 + B. », par sa valeur incontestable lors du traitement des rechutes.

Il ressort, également, de ce qui précède, que l'ordre d'activité de nos médicaments colorés cesse d'être le même quand on passe du traitement du Nagana à celui du Mal du caderas. Il est facile de voir que les changements observés doivent être mis, principalement, sur le compte des diazos. En effet, alors que certaines bases — dichlorobenzidine, dianisidine, p.diamidodiphénylurée — semblent convenir aussi bien dans le cas du Nagana que dans celui du Mal de caderas, la B. o.monosulfo paraît supérieure dans le Mal de caderas et la T. l'est certainement dans le Nagana. Quant à la B., elle ne se montre réellement meilleure, dans le Mal de caderas, qu'avec l'ac. H., ce qui prouve que l'influence des « chaînes latérales » ne doit jamais être perdue de vue.

SURRA (VIRUS INDIEN)

Nous n'avons cru devoir expérimenter ici que les 6 dérivés qui, s'étant montrés les meilleurs dans le traitement du Nagana, avaient également donné de bons résultats dans celui du Mal de caderas. Voici comment ils se sont comportés :

β Naphthylamine disulfo 2.3.6 (ac. R) + B. o.monosulfo (Trypanroth).	∞
Amidonaphthol disulfo 4.8.3.6 (ac. H) + T. (alc.-alc.)	∞ (?)
— . . . — . . . T. (ac.-alc.)	∞ (?)
— . . . — . . . Dichlorobenzidine (alc.-alc.)	∞
— . . . — . . . p.Diamidodiphénylurée....	20 jours
Naphthylène-diamine disulfo 2.7.3.6 + B.	28 jours

Les deux seules couleurs, susceptibles de guérir les animaux (souris) en une seule séance, sont donc les suivantes :

Dichlorobenzidine + ac. H (alc.-alc.).

Benzidine o.monosulfo + ac. R (Trypanroth).

comme pour le Mal de caderas; mais, ici, les différences d'ac-

tivité entre la première et la seconde se montrent bien plus accentuées (au bénéfice de « dichlorobenzidine + ac. H »). Nous ajouterons que l'atoxyl paraît venir immédiatement après le Trypanroth.

Rappelons, en passant, que le *sérum humain* peut guérir exceptionnellement les souris atteintes de *Nagana*, *Mal de caderas* et *Surra*.

Si nous comparons, maintenant, le *Nagana*, le *Mal de caderas* et le *Surra*, en nous plaçant au point de vue de l'influence des diazos, nous voyons que la dichlorobenzidine et la p.diamidodiphénylurée (avec des valeurs très inégales) conviennent pareillement aux 3 trypanosomiases. — que la B. semble supérieure pour les deux premières — que la B. o.monosulfo paraît meilleure pour le Mal de caderas que pour le Surra et pour le Surra que pour le Nagana, — et que la T. se montre certainement moins bonne pour le Mal de caderas et le Surra que pour le Nagana.

La conclusion pratique est que le dérivé « dichlorobenzidine + ac. H » constitue, à l'heure actuelle, le médicament de choix dans le traitement de la triade : *Nagana*, *Mal de caderas* et *Surra*.

TRYPANOSOMIASE HUMAINE

Nos recherches, entreprises avec les 7 couleurs mentionnées plus loin, ne sont pas encore assez avancées pour autoriser des conclusions définitives ; elles donnent déjà, cependant, une idée suffisante de l'activité comparée de ces dérivés. Le *Trypan. gambiense*, employé par nous, provenait du liquide céphalo-rachidien d'un malade (Européen) soigné à l'Hôpital Pasteur¹. Actuellement, ce virus détermine, chez les rats (de moins de 100 gr.) et les singes (*Macacus sp. variae*), une affection lente, sûrement mortelle en 1 à 2 mois ; les parasites sont presque toujours présents dans la circulation. Chez le rat, traité à la dernière période de la maladie, quand le sang offre de très nombreux trypanosomes, on ne réussit à faire disparaître ceux-ci que pendant un temps fort court. Si l'on

1. Voir L. MARTIN et J. GIRARD, *Bull. méd.*, 29 avril 1905. A LAVERAN, *Bull. Acad. Méd.*, 25 avril 1905 et *C. R. Acad. Sciences*, t. CXLII, 14 mai 1906.

veut apprécier exactement l'influence thérapeutique des couleurs en question, il est donc nécessaire d'intervenir dès le début des accidents. C'est ainsi que nous avons opéré chez le rat et le singe; l'organisme est alors débarrassé des parasites durant une assez longue période et l'on peut classer les dérivés employés d'après l'étendue de cette période. Les chiffres obtenus méritent toute confiance, parce que, pour chaque couleur, ils sont de même ordre chez le rat et le singe, et de même ordre, également, lors de la première et de la seconde rechute. Voici ces chiffres (*maxima*):

α Naphtylamine disulfo 1.5.7 + B.....	5 jours
β Naphtylamine disulfo 2.3.6 (ac. R) + B. o. monosulfo (Trypanroth). { Singe.	10 jours
{ Rat... .	20 jours
Amidonaphtol disulfo 1.8.3.6 (ac. H) + T. (ac.-alc.).....	10 jours
— — — Dichlorobenzidine.....	22 jours
— — — p.Diamidodiphénylurée.....	30 jours
— — — p.Diamidophényleglycoléther... .	26 jours
Naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6 + B.....	8 jours

C'est la p. diamidodiphénylurée qui reste ici la meilleure base (l'atoxyl se comporte à peu près comme la couleur « p. diamidodiphénylurée + ac. H »). Puis, viennent: le p. diamido-phényleglycoléther, la dichlorobenzidine et, en arrière, la B. o. monosulfo (sous forme de Trypanroth), — puis la T., — enfin, la B. (dans le dérivé naphtylène-diamine disulfo 2. 7. 3. 6 + B., dont l'arsénite de soude partage le degré d'activité. et dans l' α naphtylamine disulfo 1. 5. 7).

Nous en avons fini avec la *partie chimique* de notre travail. Dans la *partie expérimentale*, qui ne tardera pas à paraître, nous suivrons de près l'influence de nos médicaments colorés sur les diverses trypanosomiases, nous montrerons les avantages et inconvénients respectifs des meilleurs d'entre eux et cette étude nous conduira à des indications thérapeutiques, dont nous espérons que la médecine humaine et la médecine vétérinaire pourront tirer profit.

TRANSMISSION DE LA PÉRIPNEUMONIE DES BOVIDÉS AUX ESPÈCES OVINE ET CAPRINE

PAR LE DR ED. DUJARDIN-BEAUMETZ

La péripneumonie ou pleuropneumonie du gros bétail a toujours été considérée comme une maladie contagieuse exclusivement inoculable aux bovidés et l'impossibilité de la transmettre à d'autres espèces animales permettait même de confirmer le diagnostic de cette épidémie bovine.

En effet, l'inoculation expérimentale de la sérosité puisée dans le poumon hépatisé a toujours été négative chez les animaux autres que les bovidés.

« Des chèvres, des moutons, des chiens, des porcs, des oiseaux de basse-cour, l'homme lui-même, dit Willems qui le premier fit, dès 1850, cette expérience, ont subi cette inoculation sans en avoir ressenti les moindres suites, pas même celle d'une piqûre anatomique¹. »

Lorsque plus tard les expérimentateurs eurent à leur disposition une lymphe virulente et pure recueillie dans l'œdème sous-cutané du veau d'après la méthode préconisée par Pasteur, des injections massives furent maintes fois pratiquées sous la peau, dans les plèvres et le péritoine d'animaux divers, et toujours sans succès. Le mouton et la chèvre sont demeurés réfractaires à ces inoculations².

Quant aux épidémies de péripneumonie signalées chez la chèvre par Spinola, Koppitz, Féris et Lefebvre et observées chez le chameau par Vedernikoff, il n'y faut voir que des épidémies à formes pulmonaires n'ayant qu'une analogie lointaine

1. Docteur L. WILLEMS, *Cinquante années d'inoculation préventive de la péripneumonie contagieuse des bovidés (1850-1900)*, Bruxelles, 1900. Page 21.

2. Dans l'édition française des *Archives des Sciences biologiques de l'Institut Impérial de Saint-Pétersbourg* (1901) où se trouve un travail de MM. Tarkowsky et Dchounkowsky sur la péripneumonie des bœufs, il est fait mention de sérosité recueillie chez des « agneaux » et d'inoculations faites à ces animaux ; or, dans le texte original russe, il n'est pas question d'ovins et le mot russe signifiant « veau » a été traduit par erreur par le mot « agneau ». Comme l'édition française est consultée le plus souvent, nous tenons à faire cette rectification.

avec la péripneumonie bovine; d'ailleurs aucune inoculation de contrôle à des bovidés n'a permis de conclure à l'identité de ces affections.

En 1898, un notable progrès était réalisé dans la question de la péripneumonie. La découverte de l'agent pathogène et de sa culture faite par MM. Nocard et Roux¹ en collaboration avec MM. Borrel, Salimbeni et Dujardin-Beaumetz rendait facile, grâce à l'emploi de milieux nutritifs artificiels et à la méthode d'isolement du virus par la filtration, le diagnostic et l'étude de cette maladie bovine en supprimant toute inoculation de contrôle.

On sait combien sont étroites les conditions de sa culture. Si l'usage de la peptone préparée avec des estomacs de porcs d'après le procédé de L. Martin donne de bons résultats et évite l'inconstance des peptones commerciales, le rôle du sérum sanguin et de la sérine en particulier est prépondérant et sa présence est indispensable pour le développement de ce microorganisme.

Les premières cultures retirées des sacs de collodion ou de roseau qui avaient séjourné dans la cavité péritonéale de lapins et qui contenaient par suite de la sérosité de cet animal, s'étaient d'abord montrées virulentes chez les bovins inoculés; mais, après plusieurs passages en sacs, une atténuation sensible du virus avait été constatée.

C'est pourquoi dans les cultures « *in vitro* » nous avons toujours employé le sérum de bœuf. Le virus péripneumonique, dans ces conditions, a conservé sa virulence après un nombre considérable de réensemencements dans ce milieu liquide et ce sont ces cultures qui, dans la pratique vétérinaire, servent actuellement aux inoculations faites au toupillon d'après la méthode willemsoienne pour la prévention de la péripneumonie.

L'injection de telles cultures en bouillon-sérum-bœuf à d'autres animaux que les bovidés n'a abouti à aucun résultat positif: il y a donc là concordance absolue entre les résultats de l'inoculation de la culture et ceux de l'inoculation de la sérosité elle-même.

1. NOGARD et ROUX, Le microbe de la péripneumonie. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

DUJARDIN-BEAUMETZ, Le microbe de la péripneumonie et sa culture. *Thèse de Paris*, 1900.

* *

Mais nous avons pensé qu'en expérimentant sur des ruminants voisins des bovidés et en utilisant dans les milieux de culture le sérum de ces animaux, il nous serait possible de vaincre la résistance de ces espèces jusque-là réfractaires.

Devant d'abord nous adresser à la race ovine, nous avons préparé un bouillon alcalin à parties égales de peptone de pâtes de pores et de macération de viande de mouton chauffée à 80°¹. Ce milieu, additionné de sérum de mouton dans la proportion de 10 0 0, est stérilisé par filtration sur porcelaine. Le microbe d'ailleurs y végète abondamment.

D'autre part, le virus dont nous avons fait usage était d'origine sûre: il provenait d'un cas typique de péri-pneumonie et les cultures qui en sont issues sont utilisées pour les inoculations willemssiennes et ont été employées à cette époque dans les Pyrénées par MM. Constant et L. Mesnard pour vacciner les troupeaux de cette région.

* *

Le premier mouton inoculé reçoit le 15 février 1904, sous la peau du flanc gauche, une dose massive (100 c. c.) d'une culture en bouillon-sérum-mouton. Le soir même, la température s'élève à 41°7. et dès le lendemain, un œdème dur et bien

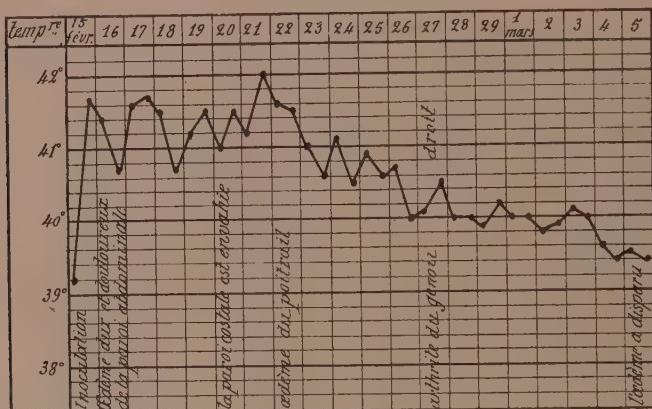
4. La question de la température à laquelle doit être portée la macération de viande n'est pas à négliger. En effet, dans les bouillons-sérum composés de macérations chauffées seulement à 65° et même à 70°, le microbe de la péri-pneumonie s'y développe lentement et mal. Cette particularité, peu sensible si l'on se sert de viande de bœuf, est remarquable si on fait usage de viande de cheval. Si cette dernière macération est portée à une température inférieure à 60°, on n'observe aucune culture même après un séjour prolongé à l'étuve. Si le milieu a été chauffé à 75°, le développement se fait avec un retard de plusieurs jours et reste maigre, alors que dans les bouillons chauffés à 80° la culture est rapide et abondante.

Le suc musculaire contient donc des substances albuminoïdes détruites par la chaleur et qui entravent la culture de la péri-pneumonie. L'hémoglobine ne peut être mise en cause puisque, dans les bouillons additionnés de sang de cheval hémolysé, la culture s'est faite parfaitement. Il en est de même pour les alexines, car le sérum qu'on ajoutait au bouillon n'avait subi aucun chauffage.

Comme il nous était impossible de constater à l'aide du microscope la culture de ce microorganisme si tenu dans ces milieux peu chauffés qui se troublent (naturellement à l'étuve, nous avons eu recours au procédé décrit par M. Marino. Ces *Annales*, 1903, p. 816.)

Après avoir versé à la surface du bouillon à étudier quelques gouttes soit de solution alcoolique de Bleu Marino, soit de celle de Giemsa légèrement étendue d'eau, l'apparition de l'anneau d'éosine nous a permis d'une façon élégante de nous renseigner sur l'existence et selon la rapidité de la réaction, sur la richesse de la culture.

limité occupe la région abdominale; peu à peu, il envahit la paroi costale et gagne successivement l'aisselle et le poitrail. Cet engorgement extrêmement douloureux est en tous points comparable à la tuméfaction qu'on observe chez le bœuf inoculé en région défendue. La sérosité limpide qu'on recueille par ponction, est ensemencée sur milieux-sérum et donne des cultures abondantes du microbe péripneumonique.



N° 1. — Mouton inoculé avec 100 c. c. de culture en bouillon-sérum-mouton.

L'animal est triste, refuse toute nourriture et reste isolé dans un coin de son box.

La courbe thermique qui s'était maintenue aux environs de 41°,5, et avait atteint 42° commence à baisser vers le 23. En même temps, l'engorgement tend à diminuer.

Le 27, on remarque une boiterie accentuée de la patte antérieure droite; l'articulation du genou est gonflée, chaude et sensible. Sa circonférence mesure 12 cent. 1/2 alors que celle de l'articulation de la patte opposée n'est que de 11 cent. 1/2.

L'ensemencement du liquide synovial donne des colonies caractéristiques de péripneumonie.

L'arthrite persiste encore une dizaine de jours et le 5 mars n'y a plus trace d'œdème; une desquamation de l'épiderme se produit dans la région de la tuméfaction disparue.

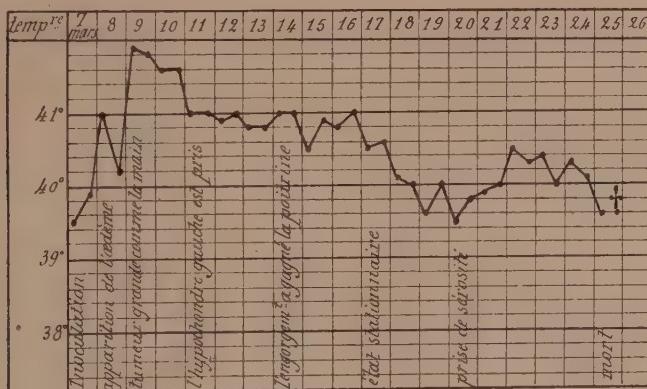
Ce mouton qui, au début de l'expérience, pesait 23 kilogr., a maigri dans de notables proportions (4 kilogr. 1/2) et ce n'est

que plusieurs semaines après, qu'il a repris son poids initial.

Nous venions donc d'assister à une véritable atteinte de péripneumonie avec engorgement caractéristique et accompagnée d'arthrite comme on l'observe couramment chez le veau. Mais un seul point différait de la péripneumonie bovine expérimentale, c'était l'absence de l'incubation quelquefois si longue et qui ne fait jamais défaut chez les bovidés. La dose massive de culture injectée dans ce cas pouvait expliquer cette évolution péripneumonique d'emblée.

Aussi, dans l'expérience suivante, nous avons limité la dose injectée à 10 c. c.

Un mouton de 26 kilogr. est inoculé le 7 mars 1904 au niveau de l'hypocondre gauche avec 10 c. c. de culture en bouillon-sérum-mouton. Le liquide injecté est résorbé le jour même; cependant dès le lendemain l'œdème commence à apparaître pour s'accroître peu à peu et envahir le thorax et le poitrail. Cet engorgement tendu et douloureux gagne les aisselles et entrave ainsi la marche de l'animal qui reste étendu sur sa litière.



N° 2. — Mouton inoculé avec 10 c. c. de culture en bouillon-sérum-mouton.

En 48 heures, la température atteint $41^{\circ}.9$ et redescend lentement chaque jour.

Une prise de sérosité limpide et ambrée est faite dans la tuméfaction et ensemencée. Les cultures sont pures et caractéristiques.

Mais la sérosité continué à s'écouler par l'orifice de la ponction; la température s'élève de nouveau et la bête affaiblie, cachectique, ne pesant plus que 17 kilogr., succombe le 26 mars.

A l'autopsie, on constate une infiltration œdémateuse de la paroi thoracique et abdominale dont le tissu cellulaire est gorgé de sérosité. Rien à noter du côté des organes abdominaux. Les poumons sont sains.

La sérosité examinée au microscope contient quelques chaînettes de streptocoques et les cultures donnent des colonies de streptocoque et de péripneumonie¹.

Enfin, dans un tube de gélose-sérum ensemencé avec le sang du cœur, se montrent deux colonies ayant tous les caractères des cultures de péripneumonie.

Pour vérifier l'authenticité de cette origine sanguine, une dose de 1 c. c. de cette culture en bouillon-sérum-mouton, est injectée le 11 mai 1904 à une brebis.

Aucune réaction locale n'apparaît dans les jours qui suivent et ce n'est que le 16, c'est-à-dire après une véritable incubation de 5 jours, que l'on peut remarquer une légère adhérence de la peau au point d'inoculation.

Le 17, ce placard œdémateux est de la dimension de la main; il est douloureux; la brebis se défend quand on palpe cette région.

La tuméfaction s'étend pour envahir l'abdomen, le thorax et le poitrail. Le bourrelet d'œdème qui occupe la région axillaire rend la marche extrêmement pénible. La bête reste couchée; l'appétit est presque nul.

La température, qui s'est élevée graduellement jusqu'à 40°, 6, s'y maintient pendant 6 jours. Puis la courbe thermique s'abaisse peu à peu; l'engorgement diminue et tout a disparu le 30 mai.

La perte de poids a été de 5 kilogr. et l'animal reste efflanqué pendant plusieurs semaines.

Voilà donc trois ruminants d'espèce réfractaire à la péripneumonie qui ont présenté, après inoculation de virus bovin cultivé en bouillon-sérum-mouton, un œdème envahissant et doulou-

1. Dans ce cas, la mort de l'animal est donc due à une infection secondaire streptococcique dont la porte d'entrée était l'orifice de la ponction pratiquée dans l'œdème péripneumonique et duquel la sérosité n'avait pas cessé de s'écouler.



N° 3. — Brebis inoculée avec 1 c. c. de culture en bouillon-sérum-mouton provenant du sang du cœur du mouton précédent.

reux, analogue à l'engorgement péripneumonique des bovidés.

Il restait à savoir si le microorganisme provenant de ces moutons et isolé de la sérosité de l'œdème, du liquide synovial et même du sang du cœur était bien le microbe de la péripneumonie. Il en avait tous les caractères : passage à travers la bougie Berkfeld, développement en bouillon-sérum, colonies en forme de clou sur gélose imbibée de sérum.

Mais ce n'était pas encore une preuve suffisante et l'inoculation de contrôle aux bovidés s'imposait.

La sérosité recueillie sur la brebis 3 fut doncensemencée en bouillon-sérum-bœuf et après réensemencements successifs dans ce milieu, la culture fut inoculée à la dose de 2 c. c. à une vache, sous la peau de l'épaule¹.

Après une incubation de douze jours, l'œdème apparaissait ; l'engorgement devint considérable et l'animal succombait. L'autopsie révéla des lésions extrêmement étendues et exclusivement sous-cutanées.

Un centimètre cube de la sérosité puisée dans l'œdème de cette vache fut injecté à une brebis, qui d'ailleurs ne présenta aucune réaction locale à la suite de cette inoculation. Cet

1. Toutes les inoculations sur les bovins ont été faites à l'Ecole d'Alfort par MM. Vallée et H. Carré qui ont eu l'obligeance de prendre en détail les observations des animaux en expérience et auxquels nous adressons tous nos remerciements,

animal se comportait donc envers cette sérosité comme tous les représentants de l'espèce ovine vis-à-vis du virus péripneumonique récueilli directement chez le bœuf.

Le résultat positif obtenu chez la vache et l'insuccès qui suivit chez la brebis l'injection de la sérosité bovine confirmaient la parfaite légitimité du virus péripneumonique dont nous avions fait usage au cours de ces expériences sur les ovins.

Il avait donc suffi d'une simple modification du milieu de culture en substituant un sérum à un autre pour provoquer chez une race réfractaire un œdème péripneumonique expérimental.

* *

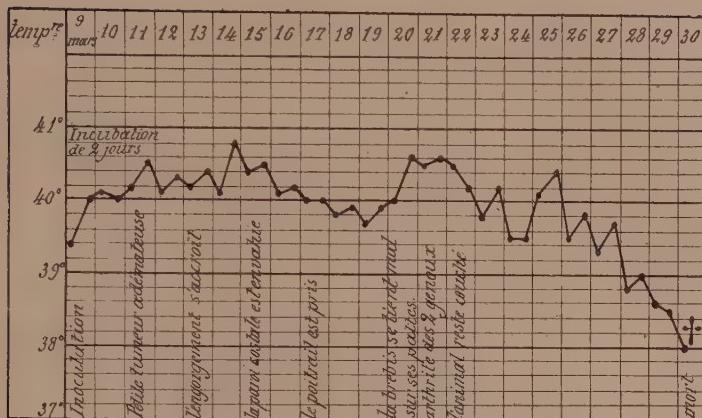
Le sérum d'autres espèces animales jouissait-il de propriétés identiques? Dans l'impossibilité de passer en revue le sérum d'animaux aussi nombreux que variés, nous avons porté notre choix sur le sérum de cheval. La facilité de se le procurer dans les laboratoires en rendait l'emploi commode. Le cheval, d'autre part, est complètement réfractaire à la péripneumonie, même quand on a pris soin d'utiliser pour l'inoculation à cet animal une culture à base de sérum équin.

Or les cultures faites dans ce nouveau milieu, injectées aux ovins, ont donné les mêmes résultats qu'avec les cultures en bouillon-sérum-mouton, comme on peut s'en rendre compte dans l'observation qui suit :

Une brebis reçoit le 9 mars 1903, sous la peau du ventre, 5 c. c. d'une culture de péripneumonie en bouillon-sérum-cheval.

Après une très courte incubation de deux jours, apparaît au point d'inoculation un placard adhérent au plan musculaire sous-jacent. La tuméfaction augmente d'étendue et envahit l'abdomen, la poitrine et les aisselles. Cet œdème en cuirasse est dur et sensible. L'anorexie est complète. La température reste élevée.

Le 22, la bête est couchée et il lui est impossible de se relever. Dès qu'on cesse de la maintenir dans la station debout, la brebis s'effondre. Les deux pattes antérieures sont à demi fléchies. L'articulation des deux genoux est chaude, gonflée, douloureuse,



N° 4. — Brebis inoculée avec 5 c. c. de culture en bouillon-sérum-cheval.

Le liquide synovial ensemencé donne des colonies nombreuses de péripneumonie.

L'animal très amaigri reste dans le décubitus latéral et après une agonie de plusieurs jours meurt le 30 mars.

A part l'infiltration du tissu cellulaire au niveau de la région sternale, dont la sérosité abondante a donné des cultures pures, on ne constate à l'autopsie aucune lésion viscérale. Les poumons sont indemnes. Le sang du cœur est stérile.

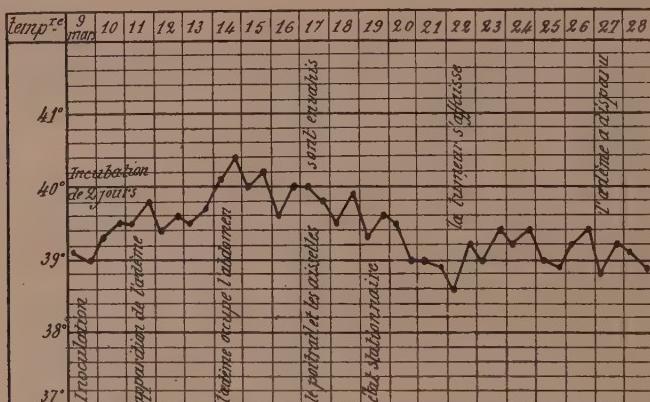
La brebis témoin qui avait reçu une dose identique, mais d'une culture en bouillon-sérum-bœuf, n'a présenté qu'une légère adhérence de la peau au niveau de l'injection. Cette réaction locale, qui n'a pas dépassé la dimension d'une pièce de 2 francs, n'a été accompagnée d'aucune élévation thermique.

Les expériences que nous avons faites sur les chèvres ont donné des résultats absolument semblables à ceux que nous avions observés chez les moutons. Que l'on fasse usage pour les inoculations de cultures en bouillon à base de sérum de chèvre, de mouton ou de cheval, l'engorgement péripneumonique est toujours la règle¹. Nous citerons par exemple l'observation suivante :

1. Chez le mouton, les cultures en sérum de chèvre provoquent de même l'œdème péripneumonique.

Cinq centimètres cubes d'une culture en bouillon-sérum-cheval sont injectés le 9 mars 1905, sous la peau du flanc d'une chèvre.

Dès le 11, apparition de l'œdème. D'abord de la dimension de la main, il s'étend progressivement. L'abdomen, le thorax et le poitrail sont envahis.



N^o 5. — Chèvre inoculée avec 5 c. c. de culture en bouillon-sérum-cheval.

L'engorgement, bien limité, est tendu, chaud et douloureux à la palpation. L'œdème ne commence à rétrograder que le 21, en même temps que s'abaisse la température. Il n'y a plus trace d'œdème le 27. L'animal est dans un état de maigreur accentué; la cachexie augmente et la chèvre meurt un mois plus tard.¹

La chèvre témoin, qui avait reçu une dose égale en bouillon-sérum-bœuf, a présenté un placard de la dimension de la main qui a persisté pendant 5 jours.

Cette tuméfaction ne peut être comparée à une évolution péripneumonique véritable; mais il semble que la chèvre jouisse d'une sensibilité spéciale vis-à-vis des cultures du virus péripneumonique et que sa résistance soit plus facile à vaincre que celle du mouton.

* * *

Chez la brebis laitière, l'injection dans la mamelle de cultures de péripneumonie n'a provoqué qu'une légère mammite

sans réaction thermique ni œdème périphérique¹. Le lait ou plutôt le liquide puriforme recueilli dans le trayon contenait le virus péripneumonique qui s'y est conservé à l'état pur pendant cinq mois, comme on peut le voir dans l'observation suivante :

Le 16 février 1904, une brebis qui avait mis bas trois jours auparavant, reçoit dans le trayon gauche 1 c. c. de culture de péripneumonie en bouillon-sérum-mouton. L'injection est faite au moyen d'une pipette mousse pour éviter toute excoriation.

Dans les jours qui suivent, la sécrétion des deux mamelles diminue et la traite ne permet de recueillir que quelques centimètres cubes de lait.

Le 20. après avoir préalablement nettoyé le trayon à l'alcool et à l'éther, on introduit une pipette mousse dans le conduit exerçeur du mamelon et le lait ainsi puisé est ensemençé dans les milieux-sérum. Les cultures sont abondantes et pures. Le lait n'est pas modifié et les glandes mammaires sont semblables dans leur volume et leur consistance.

Le 27. la mamelle gauche est sensiblement plus volumineuse que la mamelle droite. Cependant on ne remarque aucun œdème périphérique. Le lait est profondément altéré; il est grumeleux, puriforme. sa réaction est légèrement alcaline au papier tournesol.

Les cultures sont riches et ne contiennent aucun microbe étranger. Le lait de la mamelle témoin est normal.

Les prises de lait sont faites régulièrement tous les 15 jours et contiennent toujours le virus péripneumonique à l'état de pureté.

Le 16 août, c'est-à-dire cinq mois après l'inoculation, la mamelle gauche est encore hypertrophiée. A cette époque, on trouve dans le lait examiné au microscope quelques staphylocoques, mais la filtration des bouillons où s'est faite une culture mixte permet d'isoler le microbe de la péripneumonie.

A la suite de cette infection secondaire bénigne, la mammitis a disparu et il a été impossible de retrouver le virus péripneumonique qui y avait séjourné si longtemps.

1. Chez la vache laitière, M. Nocard avait, par ce procédé, conservé le virus péripneumonique pendant plus de deux mois. Mais la vache avait présenté un œdème périphérique considérable, et pendant 8 jours l'animal avait été en danger.

Pendant ces cinq mois, la brebis a été dans un état de santé parfait. Cette mammite n'a jamais été accompagnée de poussée fébrile et le poids de l'animal n'a pas fléchi.

Cette brebis, ainsi d'ailleurs que tous les ovins et caprins qui n'avaient eu, après inoculation de sérosité bovine ou de cultures en bouillon-sérum-bœuf, que des réactions nulles ou insignifiantes, ont été éprouvés avec des doses massives de cultures en milieux à base de sérum de mouton ou de cheval et pas un n'a présenté d'œdème alors que chez les animaux témoins l'engorgement était considérable. Ils avaient donc acquis une immunité solide.

* * *

Devant ces résultats probants et indéniables de transmission de la péripneumonie au mouton et à la chèvre, nous nous croyons autoriser à penser que ces animaux ne sont pas les seuls ruminants dont on pourra vaincre la résistance naturelle envers la péripneumonie des bovidés.

En s'adressant aux races les plus voisines des bovins comme par exemple les antilopes et même à des espèces plus éloignées comme les cervidés et peut-être les camélidés, et en employant dans les milieux de culture dont on fera usage pour les inoculations le sérum de l'espèce animale sur laquelle on a l'intention d'opérer, nous sommes persuadés que les expérimentateurs mieux placés que nous pour se procurer ces divers ruminants parviendront à donner à ces animaux jusque-là réfractaires un œdème péripneumonique identique à celui que nous avons obtenu chez les ovins et les caprins.

* * *

Après les constatations que nous venions de faire sur l'influence importante de la nature des sérum-s contenus dans les milieux de culture sur la production de la péripneumonie chez la chèvre et le mouton, il s'agissait de savoir ce qu'il adviendrait chez les bovidés inoculés en région défendue avec ces cultures.

La sérosité, qui provenait d'une vache ayant succombé en juillet 1904 à un engorgement péripneumonique expérimental et conservée au frigorifique, fut ensemencée dans les milieux

suivants : A. Bouillon-sérum-bœuf. — B. Bouillon-sérum-mouton. — C. Bouillon-sérum-cheval.

Plusieurs réensemencements successifs furent faits pour éliminer toute trace de la sérosité primitive ; puis, le 28 décembre 1904, 3 vaches furent inoculées en arrière de l'épaule avec 2 c. c. de ces différentes cultures.

Voici quel fut le résultat de l'expérience :

A. — La vache qui avait reçu la culture en bouillon-sérum-bœuf, présenta après 10 jours d'incubation un engorgement envahissant à la suite duquel elle mourait le 22 janvier.

B. — Celle inoculée avec la culture en bouillon-sérum-mouton fut prise d'un œdème péripneumonique typique et succombait le 15 janvier.

C. — Enfin la dernière vache, à laquelle on avait injecté la culture en bouillon-sérum-cheval, n'eut aucune réaction locale au point d'inoculation.

Cette expérience démontrait d'abord que la culture en sérum de mouton était aussi virulente chez les bovidés que la sérosité bovine elle-même.

Quant au troisième animal qui n'avait présenté aucune lésion apparente après inoculation de culture en bouillon-sérum-cheval, on ne pouvait se baser sur ce résultat négatif pour affirmer que cette culture était avirulente, car il arrive parfois que des bovins demeurent réfractaires à une injection de péripneumonie virulente.

Cependant, chez une vache inoculée plus tard en mars 1905, et cette fois avec 5 c. c. de culture en bouillon-sérum-cheval, on n'a noté qu'un œdème de la grosseur d'un œuf de pigeon.

Au mois d'août 1905, 6 bovins de races diverses (bretonne, normande, nivernaise et limousine) reçurent en région défendue 1, 2 et 5 c. c. de cultures dans le même bouillon à base de sérum de cheval et ne présentèrent durant tout le temps qu'ils ont été en observation aucune réaction apparente.

Dans la suite, tous ces bovins ont été éprouvés avec des cultures virulentes en bouillon-sérum-bœuf et n'eurent après ces injections sévères que des lésions nulles ou insignifiantes.

Mais ces expériences sur les bovins ne sont à l'heure actuelle que des expériences de laboratoire, et c'est seulement quand on aura répété ces inoculations sur un plus grand nombre d'an-

maux que l'on pourra porter un jugement sur l'innocuité et l'efficacité de ces injections dans la prévention de la péripneumonie.

Cependant, dès à présent, ces résultats sont encourageants, car ils laissent entrevoir l'espoir d'une méthode de vaccination basée sur un procédé tout à fait particulier, puisqu'il suffirait d'apporter une simple modification du milieu de culture pour conférer l'immunité aux ruminants les plus sensibles au virus péripneumonique, les bovidés.

Mais de telles recherches ne doivent être entreprises que sur une espèce animale déterminée et dans le cas en question sur les bovins exclusivement, car les résultats seront variables selon l'espèce sur laquelle on opère et suivant la nature du liquide employé pour l'injection, comme le montre le tableau ci-joint où sont résumées nos expériences à ce sujet.

NATURE du liquide inoculé.	RÉACTION chez le bœuf.	RÉACTION chez le mouton et chez la chèvre.
Sérosité bovine.	Engorgement caractéristique accompagné souvent d'arthrite chez le veau.	Rien.
Culture en bouillon-sérum-bœuf.	id.	Induration à peine perceptible et passagère.
Culture en bouillon-sérum-mouton.	id.	Oedème envahissant accompagné quelquefois d'arthrite.
Culture en bouillon-sérum-cheval.	Lésion nulle ou insignifiante.	id.

* *

L'influence du sérum contenu dans les cultures n'est donc pas douteuse dans la production de l'œdème péripneumonique expérimental. Au début, notre idée directrice avait été d'accoutumer *in vitro* le virus péripneumonique aux humeurs de l'organisme de l'animal dont on voulait vaincre la résistance naturelle. Et, en effet, les premières expériences concluantes sur la transmission de la péripneumonie aux ovins par suite de l'emploi de sérum de mouton dans les milieux nutritifs semblaient confirmer nos prévisions. Mais les résultats obtenus

ultérieurement avec le sérum de cheval sur l'espèce bovine réduisaient à néant notre hypothèse primitive.

Pour expliquer cette action, il est certain qu'il suffirait d'invoquer la présence dans le sérum de cheval de substances tantôt favorisantes, tantôt empêchantes selon l'espèce animale envisagée, mais à notre avis ce ne sont que des dénominations peu faites pour satisfaire l'esprit. Ce que nous pouvons affirmer, c'est qu'il ne s'agit pas là d'atténuation du virus péri-pneumonique, puisque, cultivé dans le même bouillon à base de sérum de cheval, il est à la fois hypervirulent pour une espèce naturellement réfractaire comme le mouton et avirulent pour des ruminants éminemment et exclusivement sensibles à la péri-pneumonie.

De plus, ce même virus, réensemencé dans un milieu contenant du sérum de bœuf, reprend tous ses caractères primitifs en laissant indemnes les ruminants réfractaires et provoquant au contraire un œdème mortel chez les bovidés.

On ne peut non plus mettre en cause la vitalité du microbe, car la richesse des cultures est égale dans ces différents milieux et souvent le développement est plus abondant dans le bouillon-sérum-cheval.

Quant au mécanisme de l'immunité, l'étude, qui n'en doit être entreprise que sur les bovidés, sera complexe et difficile par suite de l'incubation si variable et quelquefois si longue de la péri-pneumonie expérimentale et aussi à cause de l'impossibilité de suivre dans l'organisme le sort de ce microorganisme dont la ténacité est telle que le microscope est impuissant à déceler sa présence dans la sérosité.

Ces recherches nous indiquent, d'autre part, combien la moindre modification apportée à un milieu peut fausser le résultat d'une expérience. En supposant, par exemple, que le sérum de lapin ait joui de propriétés identiques à celles que possède le sérum de cheval, la découverte de l'agent pathogène de la péri-pneumonie aurait été, dès le principe, définitivement entravée. En effet, le liquide puisé dans les sacs de collodium après leur séjour dans la cavité péritonéale du lapin contenait de la sérosité de ce rongeur. Or, ce liquide légèrement opalescent, dans lequel le microscope ne parvenait pas à définir de forme bactérienne et dont l'ensemencement dans les milieux usuels demeurait stérile, n'aurait occasionné aucun trouble aux bovidés

inoculés, d'où la conclusion évidente que ce liquide ne contenait pas le virus spécifique de la péripneumonie, bien que sa présence y fût des plus réelles.

Il ne faudrait donc pas attribuer à l'inoculation positive de contrôle l'importance qui lui a été toujours attachée. Il n'est pas impossible qu'avec les agents pathogènes dont la culture nous est encore inconnue et dont les conditions de développement seront certainement des plus étroites, on observe comme avec la péripneumonie des insuccès à la suite d'injections expérimentales. Mais l'immunité conférée par ces inoculations négatives vis-à-vis d'un virus d'origine directe pourra lever tous les doutes et affirmer la spécificité de l'agent pathogène dont on poursuit la recherche.

* * *

Avant de terminer, nous voudrions parler des propriétés du sérum d'un cheval auquel nous avons injecté des doses massives de cultures de péripneumonie.

On savait déjà que le sérum d'une vache qui avait reçu près de 5 litres de cultures virulentes, était doué d'un pouvoir préventif certain mais que son action curative était médiocre¹. De plus, ce sérum bovin n'était pas agglutinant et le microbe de la péripneumonie se développait aussi bien dans le bouillon additionné de ce sérum antipéripneumonique que dans les milieux contenant du sérum normal.

Il en est de même du sérum de moutons hyperimmunisés avec lequel nous ne sommes jamais parvenus à agglutiner les cultures de péripneumonie.

Ayant constaté l'influence indubitable du sérum équin sur le virus péripneumonique nous nous sommes adressés au cheval pour l'obtention possible d'un sérum antipéripneumonique. Pendant plus de quatre mois et chaque semaine, un cheval reçut en injections sous-cutanées, à la dose de 1.500 c. c. des cultures virulentes de péripneumonie faites, bien entendu dans du bouillon-sérum-cheval pour éviter les précipitines qui auraient été la cause d'erreur dans nos expériences ultérieures.

Ces injections massives n'ont d'ailleurs provoqué chez le cheval aucun symptôme morbide ni réaction thermique.

^{1.} NOGARD, ROUX et DUJARDIN-BEAUMETZ, Études sur la péripneumonie (2^e note). *Bullet. de la Soc. centr. de méd. vétérinaire*, 1899, page 442.

L'œdème indolore résultant de la masse liquide injectée se résolvait en quelques jours.

Disons de suite que ce sérum injecté à doses répétées de 250 c. c. n'a pas réussi à enrayer chez un bœuf un engorgement péripneumonique et que l'animal, malgré cette intervention sérothérapeutique a succombé. Il ne faut donc pas compter sur l'emploi de ce sérum pour la guérison de la péripneumonie bovine.

Cependant ce sérum équin jouit de propriétés agglutinantes manifestes. Quand on l'ajoute à des cultures jeunes en bouillon dans la proportion de 1/30, l'agglutination se fait parfaitement et le milieu se clarifie en quelques heures. Avec les dilutions plus étendues au 1/200^e par exemple, il n'y a pas de clarification et on ne note dans le milieu qu'un trouble plus accentué que dans les tubes témoins. Cette opacité est due à la formation de grumeaux microbiens qui interceptent les rayons lumineux.

Si la proportion de sérum est suffisante pour que l'agglutination soit complète, il est facile de recueillir au fond du tube un culot visqueux qui représente la masse microbienne de la culture. C'est ainsi que 100 c. c. de culture en bouillon-sérum ont donné, après agglutination, un précipité qui, lavé à l'eau distillée et séché, pesait près de 15 milligrammes. L'agglutination est accélérée si les tubes sont mis au bain-marie à 45° et si on a le soin d'agiter le mélange pour activer l'agglomération microbienne.

Ensemencé dans un bouillon additionné de sérum agglutinant, le microbe de la péripneumonie se développe mal et sous forme d'amas qui se rassemblent dans la partie inférieure des tubes.

Enfin le filtrat de cultures de péripneumonie est précipité par ce sérum équin.

Nous avons aussi recherché si ce sérum agglutinant et précipitant donnerait une réaction quelconque en présence de sérum de bovins ayant eu une atteinte antérieure de péripneumonie.

Quatre échantillons de sérums à examiner et ne portant comme indication qu'un numéro d'ordre nous avaient été remis par M. Vallée. Ces sérums préalablement filtrés sur porcelaine furent mélangés à parties égales avec notre sérum équin.

Après une heure de séjour au bain-marie à 45°, les n°s 1 et 2 étaient franchement opalins surtout si l'on prenait le soin de les regarder devant une source lumineuse dans une chambre obscure. Les n°s 3 et 4, dans les mêmes conditions, étaient à peine opalescents.

Pour assurer notre diagnostic nous avons, avec l'aide de M. Mouton, examiné ces échantillons à l'ultra-microscope. Placés sous la lamelle de mica et observés avec un grossissement de 180 diamètres environ (16.0 Apochr. Zeiss. — Ocul. Compens. 12) ces sérums, nous offrent l'aspect suivant :

Échantillons 1 et 2. — Particules peu nombreuses, très brillantes.

Échantillons 3 et 4. — Très nombreuses et très fines particules répandues uniformément dans les préparations.

Nul doute qu'il n'y ait eu précipitation dans les échantillons 1 et 2. Or nos prévisions étaient exactes car les deux bovins dont provénaient ces sérums avaient présenté quatre mois auparavant des engorgements péripneumoniques peu étendus, alors que les n°s 3 et 4 avaient été recueillis chez des animaux neufs.

Nous pensons donc que ce séro-diagnostic, bien qu'il soit d'une exécution délicate et qu'il doive toujours être fait comparativement avec des sérums témoins, peut cependant servir à confirmer le diagnostic clinique de cette maladie qui, dans certains cas chroniques, présente souvent de réelles difficultés. Il permettra de dépister la péripneumonie chez les animaux porteurs de lésions latentes qui sont les propagateurs de cette épizootie.

SUR LES RELATIONS DES SENSIBILISATRICES AVEC L'ALEXINE

PAR LES DR^{ES} J. BORDET ET FREDERICK P. GAY

(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

Les expérimentateurs qui ont étudié l'hémolyse professent des idées fort divergentes au sujet des relations qui s'établissent entre le globule sensible et les substances actives, sensibilisatrice (ambocepteur) et alexine (complément). Il est bien connu, d'abord que les globules fixent la sensibilisatrice (Ehrlich et Morgenroth), ensuite que les globules ainsi modifiés ont acquis le pouvoir, qu'ils ne possédaient pas auparavant, d'absorber l'alexine avec une énergie telle qu'ils peuvent en dépouiller complètement le liquide ambiant (Bordet). Il résulte immédiatement de ces données que la sensibilisatrice joue véritablement un rôle d'intermédiaire assurant l'union de l'élément sensible avec la matière toxique pour cet élément, c'est-à-dire avec l'alexine.

Qu'il existe dans le globule une matière spéciale, peu connue du reste, qui s'empare de la sensibilisatrice et forme avec elle un complexe, tout le monde évidemment l'admet. L'expérience en effet le démontre. Elle ne démontre d'ailleurs rien de plus : la réaction n'est guère connue dans son intimité.

Il est superflu d'ajouter que l'on ne gagne rien à habiller le fait avec des mots. Dire que le globule reçoit et garde la sensibilisatrice parce qu'il possède un récepteur, ou que la sensibilisatrice se combine à ce dernier parce qu'elle possède un groupement cytophile combinable, c'est se donner à peu de frais l'illusion d'en savoir davantage. Bornons-nous donc à énoncer qu'il se forme un complexe.

Mais pourquoi ce complexe (sensibilisatrice-globule) est-il apte à fixer l'alexine ? A quel constituant du complexe faut-il attribuer l'affinité pour cette matière ? Ce n'est pas au globule considéré isolément : en effet des globules normaux, non sen-

sibilisés, ne se chargent pas de cette substance active. Est-ce à la sensibilisatrice? Ou bien le complexe, dès sa formation, manifeste-t-il pour l'alexine une avidité que ne montrent isolément ni l'un ni l'autre des éléments qui le composent?

Ces deux hypothèses ont été formulées. La première (la sensibilisatrice se combine à l'alexine) a été émise par Ehrlich et Morgenroth. Pour ces savants, la molécule de la sensibilisatrice possède, à côté du groupement atomique qui se soude au récepteur cellulaire (groupement cytophile), un second groupement (complémentophile) très distinct du premier et qui s'unit à l'alexine. Cette conception, d'après laquelle la sensibilisatrice fonctionne très exactement comme un trait d'union s'attachant par un bout au globule et par l'autre à l'alexine¹, suggère immédiatement deux remarques :

D'abord le globule ne participe pas directement à l'absorption de l'alexine; il n'intervient que pour saisir la sensibilisatrice; son rôle est alors terminé; c'est cette dernière substance qui entre en jeu désormais, grâce à ses affinités propres, pour accaparer l'alexine.

Ensuite, la thèse d'Ehrlich et Morgenroth se concilie fort bien avec l'idée que l'absorption de l'alexine serait vraiment une réaction purement chimique: elle fait intervenir en effet des affinités manifestées par des atomes ou groupements d'atomes, le complexe récepteur — sensibilisatrice — alexine pouvant dès lors être considéré comme une vaste molécule unique dont le noyau est la sensibilisatrice, dont les chaînes latérales sont le récepteur et l'alexine..

Celle-ci s'incorpore donc dans un composé chimique nouveau et défini, son absorption ne saurait être comparée ni aux phénomènes de collage (par exemple à la fixation d'une toxine sur un précipité), ni à de nombreuses actions de teinture où les molécules du corps teint attirent celles de la couleur sans qu'on puisse invoquer la mise en œuvre d'affinités atomiques. — les molécules associées gardant leur individualité et pouvant être séparées à nouveau par des moyens purement physiques, — ni aux faits si fréquents de précipitation, agglutination ou coagulation mutuelle de substances colloïdales. ni en

1. C'est, on le sait, conformément à cette idée que Ehrlich et Morgenroth donnent à la sensibilisatrice le nom suggestif d'ambrocepteur.

général à ces phénomènes si variés et si multiples qui dépendent de l'adhésion moléculaire.

Suivant une seconde tentative d'explication, proposée il y a quelques années par l'un des auteurs du présent article, la sensibilisatrice ne se combine point, par elle-même, avec l'alexine. Mais, en s'unissant au globule, elle forme un complexe qui présente cette propriété nouvelle de pouvoir s'attacher l'alexine, et de l'enlever ainsi du liquide ambiant; en d'autres termes, ni la matière propre au globule, ni la sensibilisatrice ne manifestent, à l'état isolé, pour l'alexine, d'affinité perceptible; celle-ci ne devient évidente que lorsque la matière propre au globule s'est modifiée (sensibilisée) par son union avec la sensibilisatrice, s'est transformée ainsi en un complexe auquel l'alexine adhère avec facilité.

Dans cette hypothèse, il n'est donc plus question d'un groupe complémentophile propre à la sensibilisatrice et chargé d'opérer la capture de l'alexine sans participation du globule; celui-ci intervient directement dans la fixation, puisqu'il fournit en partie tout au moins les éléments constitutifs du complexe absorbant¹.

Il faut remarquer immédiatement que cette seconde manière de voir, d'après laquelle la sensibilisatrice ne posséderait pas de groupe complémentophile, est beaucoup moins compatible que celle d'Ehrlich et Morgenroth avec l'idée que la fixation de

1. A vrai dire, Ehrlich et Morgenroth ont modifié dans la suite leur théorie primitive, au moins pour ce qui concerne certaines sensibilisatrices ou alexines et certains globules. Ils admettent que, dans certains cas, la sensibilisatrice ne manifeste d'affinité pour l'alexine que quand elle s'est au préalable combinée au globule. Il devient difficile, on doit le reconnaître, de discuter et de juger une théorie sujette d'une année à l'autre à de pareilles modifications.

Dire en effet que la sensibilisatrice ne se combine à l'alexine qu'après s'être unie déjà à un globule, c'est adopter à une nuance près la conception de Bordet, d'après laquelle ni l'un ni l'autre des constituants du complexe ne possède isolément la faculté fixatrice; c'est renoncer à l'idée tant défendue au début, si nettement schématisée et qui était essentielle dans la thèse, à savoir que, même en l'absence de globules, l'alexine est néanmoins unie à la sensibilisatrice.

Dans ces conditions, l'intervention du globule étant reconnue nécessaire, les deux théories (celle de E et M, celle de B) ne se distinguent plus que par des subtilités.

Il est juste d'ajouter immédiatement que si, comme nous venons de le rappeler, Ehrlich et Morgenroth admettent dans certains cas que la sensibilisatrice ne prend l'alexine qu'après s'être unie préalablement au globule, dans d'autres cas, ils formulent l'opinion opposée, à savoir que le fait d'être au préalable combinée à l'alexine augmente chez la sensibilisatrice l'affinité pour le globule sensible.

l'alexine représente une réaction chimique vraie, c'est-à-dire implique la production d'un composé nouveau bien défini.

A moins de supposer en effet que l'adjonction de la sensibilisatrice au récepteur du globule soit en réalité plus qu'une simple soudure, à moins d'imaginer que cette union modifie profondément les molécules intéressées en y créant des dispositions atomiques nouvelles, on ne voit pas bien comment cette combinaison pourrait donner naissance à des groupements atomiques avides d'alexine, et dont on ne trouvait point de trace dans chacun des deux corps qui participent à la réaction.

Mais cette seconde conception s'harmonise au contraire très facilement avec l'idée que l'alexine est entraînée et absorbée grâce à l'intervention, non pas d'affinités chimiques véritables, mais de l'adhésion moléculaire.

Il suffit en effet de supposer que la matière propre au globule qui s'unit à la sensibilisatrice, est par le fait même modifiée dans ses propriétés d'adhésion, que le complexe formé est capable de se coller à l'alexine et de s'en emparer, à la façon dont le fluorure calcique (ou d'autres précipités chimiquement inertes) très divisé, à l'état de suspension fine (si fine qu'elle peut revêtir l'aspect colloïdal) enlève le fibrinogène d'un plasma auquel on le mélange.

Ne voyons-nous pas, s'il faut chercher des exemples, sinon entièrement identifiables, au moins analogues, un changement dans l'adhésion moléculaire des microbes intervenir à titre essentiel dans l'agglutination microbienne ? N'est-ce pas un changement dans leur adhésion moléculaire qui force les microbes traités par l'agglutinine à s'agglomérer sous l'action du sel marin, lequel ne flocule pas des bactéries normales ?

Envisagée sous cet aspect, la question de la fixation de l'alexine est d'un intérêt plus réel et plus général qu'il ne paraît de prime abord. Quand on cherche à comprendre, en s'aidant de comparaisons et de rapprochements avec des faits plus simples et plus abordables, les réactions délicates qui s'effectuent dans les liquides de l'organisme, est-ce toujours, comme Ehrlich et Morgenroth ont tendance à le faire, dans le cadre de la chimie proprement dite, où les réactions s'opèrent suivant des proportions strictement définies, donnent naissance à des composés de constitution invariable, justiciable d'une

formule, et jamais dans la catégorie de ces phénomènes de contact ou d'adhésion moléculaire, flocculation, coagulation, émulsion, teinture, collage, etc., qu'il faut chercher des exemples et d'instructives analogies?

Lorsqu'on cherche à démontrer expérimentalement la proposition principale d'Ehrlich et Morgenroth, à savoir que, même en l'absence de globules, la sensibilisatrice peut se combiner à l'alexine, on obtient des résultats négatifs : dans ces conditions, l'alexine reste entièrement libre, ainsi que le montrent des expériences antérieures auxquelles nous renvoyons le lecteur¹.

Cherchant à établir le bien-fondé de leur assertion, Ehrlich et Sachs² ont beaucoup insisté sur la prétendue déviation du complément que mettraient en évidence les expériences bien connues de Neisser et Wechsberg sur l'influence antibactériolytique d'un excès de sensibilisatrice en présence d'une quantité relativement faible d'alexine.

Mais cette déviation du complément (due d'après ces auteurs à ce que l'excès de sensibilisatrice, resté libre dans le liquide, et que refusent les microbes déjà saturés de cette substance, accapareraient pour son propre compte une portion de l'alexine et empêcherait ainsi cette fraction de se porter sur les microbes pour les bactériolyser) n'a jamais été convenablement prouvée ; l'interprétation du phénomène de N et W est entièrement remise en question à l'heure actuelle, divers savants proposant en effet des explications nouvelles et qui ne ressemblent nullement à celle qu'Ehrlich et son école ont défendue (Gay³, Moreschi⁴, Buxton⁵).

L'étude du venin des serpents semblait avoir fourni à Kyes et Sachs⁶ la confirmation de cette thèse de la déviation du complément, mais Hideyo Noguchi⁷ a montré ensuite que les phénomènes observés s'expliquaient tout autrement.

Il n'y a donc aucune raison valable d'admettre, comme le font Ehrlich et Morgenroth conformément à leur théorie, que

1. BORDET, Les Sérum cytolytiques. *Annales Pasteur*, 1904, p. 307.

2. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1902, n° 21.

3. *Annales Pasteur*, octobre 1905.

4. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1906, p. 100.

5. *Journ. med. Research.*, vol. XIII, 1905, p. 434.

6. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1903, nos 2-4.

7. *Journal of experimental medicine*, vol. VII, april 1905.

lorsqu'une alexine donnée se montre impuissante à détruire un globule impressionné par une sensibilisatrice déterminée, la raison de cette inaptitude gît en ce que cette alexine ne se combine pas à cette sensibilisatrice. Telle alexine ne doit pas son énergie ou son inactivité à ce fait qu'elle s'adapte ou ne s'adapte pas à l'hypothétique groupement complémentophile de la sensibilisatrice mise en jeu. Les désignations de « passende » « nicht passende Complemente » ne correspondent à rien de réel.

En effet, à quelle alexine une sensibilisatrice de cheval aurait-elle en bonne logique le plus de chances d'être combinable ? Évidemment à l'alexine de même espèce, à l'alexine de cheval. Or, le sérum de cheval contient une sensibilisatrice impressionnant les globules de cobaye, qui cependant ne détruit guère ces hématies en présence d'alexine de cheval, mais qui les hémolyse en présence d'alexine de cobaye.

Admettra-t-on que cette sensibilisatrice se combine mieux à cette seconde alexine qu'à la première ? N'est-il pas plus rationnel d'admettre simplement que les deux alexines sont absorbables par les globules sensibilisés, mais que celle du cheval est par elle-même peu toxique, peu apte à opérer l'hémolyse¹ ?

Autre exemple : le sérum de lapin neuf contient une sensibilisatrice active à l'égard du globule de chèvre. Mais cette matière provoque beaucoup mieux l'hémolyse si on l'associe à l'alexine de cobaye (laquelle employée seule est inactive, le sérum de cobaye manquant de sensibilisatrice) que si on l'additionne d'alexine de même espèce (lapin)².

Ce qui intervient en réalité, ce que Ehrlich et Morgenroth négligent, c'est l'aptitude propre de chaque alexine à détruire

1. Dans cet ordre d'idées, on démontrera plus loin que l'alexine de cheval est fort bien absorbée par les globules sensibilisés de bœuf, qu'elle ne détruit pas. — Des faits analogues ont été signalés encore par Muir (*Proceedings of the royal Society*, vol. 74, p. 305, 1904) et par Gay (*Centralbl. f. Bakteriol.*, XXXIX, p. 472, 1905).

2. Expérience : On verse dans quatre tubes 1 c. c. d'émulsion de globules de chèvre à 10 0'0 dans la solution physiologique. On ajoute au tube *a* 0,4 c. c. de sérum de lapin frais, au tube *b* 0,2 c. c. de sérum frais de cobaye, au tube *c* 0,2 c. c. de sérum de lapin et 0,1 c. c. de sérum de cobaye, au tube *d* 0,4 c. c. de sérum de lapin et 0,1 c. c. de sérum de cobaye. Résultat : Au bout d'une demi-heure en *d*, d'une heure en *c*, hémolyse complète. Trace d'hémolyse en *a*, pas d'hémolyse en *b*, au bout d'une heure.

le globule en expérience, c'est le pouvoir toxique qu'elle possède par elle-même pour tel ou tel élément. Que la valeur hémo ou bactériolytique des alexines varie d'une espèce animale à l'autre, rien de plus admissible, les alexines d'espèces différentes n'étant pas entièrement identiques.

Il est cependant une expérience, relatée par Ehrlich et Sachs¹, qui, si l'interprétation qu'en donnent ces auteurs était exacte, démontrerait d'une façon tout à fait certaine et indiscutable le fait que l'alexine s'unirait réellement à la sensibilisatrice.

Bien plus, il semble même, dans l'exemple en question, que la sensibilisatrice ne se soude au globule qu'après avoir fixé préalablement l'alexine. L'union de la sensibilisatrice avec l'alexine serait dans ce cas une condition tellement indispensable à l'hémolyse, que la destruction de l'alexine amènerait une véritable paralysie de la sensibilisatrice elle-même, dont les affinités pour le globule seraient désormais anéanties ou tout au moins fort déprimées : en d'autres termes, le groupement cytophile n'est capable d'entrer en réaction avec le globule que si l'affinité du groupement complémentophile pour l'alexine est satisfaite.

Reste à savoir, bien entendu, si Ehrlich et Sachs ne se sont pas complètement mépris sur le sens de leur expérience. C'est ce que nous allons examiner. La sensibilisatrice qu'ils étudient est du sérum normal (chauffé à 56°) de bœuf, les globules provenant du cobaye, et l'alexine du cheval. Le présent article pourrait donc s'intituler : Les propriétés du sérum de bœuf et leur signification pour l'hémolyse.

* *

Rappelons tout d'abord les faits observés par Ehrlich et Sachs. Le sérum de bœuf, chauffé au préalable à 56°, ne détruit naturellement pas les globules de cobaye, puisque le chauffage l'a privé de son alexine. D'autre part, le sérum frais (alexine) de cheval ne manifeste qu'un pouvoir hémolysant très faible à l'égard de ces mêmes globules. Mais le sérum chauffé de bœuf se comporte comme s'il sensibilisait les globules à l'action de l'alexine de cheval, laquelle, employée seule, se montre fort

peu active. En effet (expérience I) on observe une hémolyse intense quand on prépare un mélange, en proportions convenables¹, de globules de cobaye, de sérum (préalablement chauffé) de bœuf et de sérum frais de cheval. Jusqu'ici, rien de surprenant. Mais, dans une seconde expérience, mettons des globules en contact avec le sérum de bœuf: au bout d'un certain temps, centrifugeons, décantons le liquide surnageant pour en séparer les globules. Ceux-ci, additionnés ensuite de sérum de cheval, ne s'y détruisent pas. Tout passe donc (et telle est l'opinion d'Ehrlich et Sachs) comme s'ils n'avaient pas absorbé la sensibilisatrice du sérum de bœuf, malgré leur contact préalable avec ce sérum. Cette conclusion paraît nettement corroborée par le fait que le liquide surnageant dont il vient d'être question (sérum de bœuf 56° qui a été au contact avec les globules, dont on le sépare par centrifugation et décantation), se comporte comme si les globules n'en avaient soustrait aucun principe actif. En effet, si on ajoute ultérieurement à ce liquide surnageant du sérum frais de cheval, puis des globules nouveaux, ceux-ci s'hémolysent. Au surplus, des globules de cobaye traités par du sérum de bœuf, et qui restent intacts si on les transporte (après élimination de l'excès de sérum de bœuf) dans de l'alexine de cheval, ne se distinguent pas de globules neufs de cobaye, c'est-à-dire qui n'auraient pas subi de contact préalable avec le sérum de bœuf; en effet, ils se détruisent très bien quand on les introduit dans le mélange sérum de bœuf 56° + alexine de cheval.

L'interprétation d'Ehrlich et Sachs est, comme nous l'avons brièvement rappelé plus haut, la suivante: La sensibilisatrice de bœuf se fixe très bien sur les globules lorsque son affinité pour l'alexine (de cheval) est satisfaite, en d'autres termes quand son groupement complémentophile est saturé. C'est pourquoi les globules de cobaye s'hémolysent dans le mélange des deux sérum. Mais si la sensibilisatrice n'est pas au préalable combinée à l'alexine, elle ne montre pour les globules qu'une affinité nulle ou très faible. C'est pourquoi ceux-ci restent intacts quand on les traite non pas simultanément, mais successivement, d'abord par le sérum de bœuf 56°, puis par l'alexine de

1. Par exemple: 4 c.c. d'émulsion de sang de cobaye à 5% dans la solution physiologique, 0,5 c.c. de sérum de bœuf 56°, 0,5 c.c. de sérum frais de cheval.

cheval. Si l'idée est exacte, il faut admettre (et telle est la conclusion d'Ehrlich et Sachs) que la saturation du groupe complémentophile par l'alexine augmente l'énergie chimique du groupe cytophile, c'est-à-dire accroît l'affinité de ce dernier pour le globule.

En théorie, on ne voit pas clairement comment une semblable répercussion pourrait s'opérer, étant donné que les deux groupements sont, d'après la théorie d'Ehrlich, distincts et indépendants l'un de l'autre. Mais il convient de rester dans le domaine des faits expérimentaux. A vrai dire, ceux que nous venons de rappeler sont les seuls qu'Ehrlich et Sachs aient mis en évidence; comme nous allons le voir, il eût été préférable que ces savants, ayant d'interpréter, eussent poussé leurs investigations plus loin et recueilli des faits plus nombreux.

Il est notamment un fait qui paraît avoir échappé à ces auteurs et qui pourtant est remarquable et doit certes entrer en ligne de compte dans toute tentative d'explication correcte. Le sérum de bœuf chauffé à 56° n'agglutine que faiblement les globules de cobaye. Le sérum de cheval frais les agglutine, mais seulement avec une remarquable lenteur et à dose assez forte; il peut s'écouler des heures avant que les globules forment des amas d'un certain volume. Au contraire, le mélange des deux sérums agglutine rapidement, en quelques minutes, les globules qui bientôt forment de véritables blocs adhérant volontiers à la paroi de verre. Citons à ce propos une expérience dans laquelle interviennent du sérum frais de cheval (alexine), du sérum de bœuf préalablement chauffé à 56° et une émulsion à 5° dans la solution physiologique, de sang de cobaye (préalablement lavé à la solution physiologique pour éliminer le sérum); on prépare les mélanges suivants:

1. Emulsion de globules 1 c.c.; sérum de bœuf 56°: 0,5 c.c.

2. Emulsion de globules 1 c.c.; sérum de cheval 0,5 c.c.

3. Emulsion de globules 1 c.c.; 0,5 c.c. d'un mélange à parties égales de sérum de bœuf 56° et de sérum de cheval.

Au bout de quelques minutes, une agglutination extrêmement intense apparaît dans le mélange 3; un peu plus tard l'hémolyse y débute et peut ensuite devenir complète; les mélanges 1 et 2 non seulement ne s'hémolysent pas, mais ne

manifestent qu'une agglutination des globules très lente et jamais comparable à celle du mélange 3.

On peut réaliser l'expérience, avec une légère variante, en préparant encore des mélanges identiques à 1 et à 2, où les globules ne s'agglutinent pas. Mais si l'un des mélanges est ajouté à l'autre, si les sérum de bœuf et de cheval se trouvent ainsi réunis, très rapidement ces globules s'agglutinent puis perdent leur hémoglobine¹. Ajoutons immédiatement que si l'on mélange à du sérum de bœuf 56°, non plus du sérum frais de cheval, mais du sérum de cheval qui a été chauffé au préalable à 56°, la mixture obtenue non seulement est inactive au point de vue hémolytique, ce qui est tout naturel, mais ne manifeste point le pouvoir agglutinant intense dont il vient d'être question. Il semble donc que ce dernier soit lié à la présence d'alexine active.

Cette constatation est assez singulière. Si on tentait de l'expliquer d'après l'idée d'Ehrlich et Sachs, on devrait admettre que, comme la sensibilisatrice elle-même, l'agglutinine ne s'unit au globule qu'à la condition de s'être au préalable combinée à l'alexine. Une conclusion semblable est étrange, car jamais aucun fait n'a invité à croire que les agglutinines ont besoin, pour agir, de s'unir à l'alexine.

La théorie d'Ehrlich et Sachs, relative au mode d'action du mélange des sérum de bœuf et de cheval, nous paraît donc, dès à présent, suspecte. Il convient, par conséquent, de serrer de plus près l'argumentation dont ces auteurs se sont servis pour l'établir. Suivons, point par point, leur raisonnement :

1^o Pour démontrer qu'en l'absence de sérum de cheval, la sensibilisatrice du sérum de bœuf 56° ne se combine pas aux globules de cobaye, ces savants se fondent sur le fait que les hématies, traitées tout d'abord par le sérum de bœuf dont l'excès est ensuite éliminé par centrifugation, restent intactes quand on les plonge ultérieurement dans l'alexine de cheval. Ce raisonnement ne serait valable que si l'alexine de cheval était capable d'hémolysier à coup sûr, sans exception, les globules sensibilisés qu'on lui présente. Or, tel n'est pas le cas. L'alexine de cheval a justement ceci de remarquable qu'elle ne

1. L'agglutination s'opère fort bien à la température ordinaire, mais l'hémolyse est favorisée par le séjour à l'étuve à 37°.

ressemble pas aux alexines de la plupart des autres animaux. MM. Ehrlich et Morgenroth ont eux-mêmes constaté¹ que des globules de bœuf, sensibilisés par du sérum (chauffé à 56°) de lapin immunisé contre le sang de bœuf, restent intacts dans l'alexine de cheval, tandis qu'ils se détruisent sous l'influence de doses minimes d'alexine de lapin ou de cobaye. Ils ont expliqué ce fait en disant que l'alexine de cheval ne « complète » pas la sensibilisatrice de lapin active sur l'hématie de bœuf, c'est-à-dire qu'elle ne se combine pas au groupe complémentophile de cette sensibilisatrice, ce qui revient à dire qu'elle n'est pas absorbée par les globules sensibilisés. Soit dit en passant, cette opinion est d'ailleurs erronée; il est facile de démontrer, on le verra plus loin, que l'alexine se fixe sur ces hématies, mais qu'elle est néanmoins, même à haute dose, incapable de les détruire².

Rien ne nous constraint donc à accepter que si les globules de cobaye traités au préalable par du sérum de bœuf restent intacts ensuite dans l'alexine de cheval, cela tient à ce que ces globules n'ont pas été sensibilisés. En effet, même lorsqu'ils le sont incontestablement, ils résistent à cette alexine. Des globules de cobaye, dûment sensibilisés (par du sérum, chauffé à 56°, de lapin immunisé contre le sang de cobaye) et qui s'hémolysent sous l'influence de traces de sérum frais de lapin ou même de cobaye, restent intacts dans des doses moyennes et ne s'hémolysent qu'avec une paresse remarquable dans des doses très fortes d'alexine de cheval.

Au surplus, il est facile de démontrer qu'il existe dans le sérum de bœuf 56° une sensibilisatrice capable d'impressionner les globules de cobaye, médiocrement puissante il est vrai, mais qui obéit à la loi générale en ce sens qu'elle se fixe sur les globules même en l'absence d'alexine.

L'introduction de quelques dixièmes de c. c. de sérum de bœuf 56° dans un mélange d'alexine de cobaye (0,3 c. c.) avec des globules de cobaye (1 c. c. d'émulsion à 50/0 de sang dans la solution physiologique) provoque en effet l'hémolyse. Mais

1. Ueber Hæmolysine, VI Mittheilung, *Berl. Klin. Wochenschr.* 1901, nos 21 et 22.

2. Nous ne voyons pas d'inconvénient à ce que l'on énonce ce fait en disant, suivant le langage d'Ehrlich, que l'alexine de cheval n'a pas de groupement toxophore ou que le groupement semblable qu'elle possède est insuffisamment actif.

celle-ci ne s'observe pas si dans l'expérience on fait intervenir, au lieu de sérum de bœuf 56° normal, du sérum de bœuf 56° qui a été au préalable traité par une quantité suffisante de globules lavés de cobaye (lesquels fixent la sensibilisatrice) et en a été séparé ensuite par centrifugation.

2^o Ehrlich et Sachs admettent que dans leur expérience fondamentale (hémolyse des globules de cobaye dans le mélange de sérum de cheval frais et de sérum de bœuf 56°) c'est uniquement le sérum de bœuf qui intervient à titre de sérum sensibilisateur. Rien ne le démontre : en effet, le sérum de cheval contient également une sensibilisatrice (plus active même en général que celle du bœuf) capable d'impressionner les globules de cobaye. En effet, un mélange de sérum de cheval (0,3 c. c. par exemple) et de globules de cobaye (1 c. c. d'émulsion à 5 0/0) présente l'hémolyse si on l'additionne d'alexine de cobaye (0,3 c. c.). Il n'y a pas lieu de s'étonner de ce qu'employé seul (sans le concours de l'alexine de cobaye) le sérum frais de cheval n'hémolyse pas les globules de cobaye, bien qu'il possède à la fois une sensibilisatrice et de l'alexine ; nous venons de voir en effet que l'alexine de cheval ne détruit pas ces hématies, même lorsqu'elles sont dûment sensibilisées. Notons en passant que la sensibilisatrice de cheval est remarquablement thermolabile ; le sérum de cheval chauffé à 56° a perdu presque entièrement son pouvoir sensibilisateur.

3^o Pour Ehrlich et Sachs, c'est uniquement en sensibilisant les globules que le sérum de bœuf intervient dans leur expérience fondamentale.

En réalité, son rôle n'est-il pas plus complexe ? Est-ce même comme sensibilisateur qu'il agit principalement ? A côté de la sensibilisatrice proprement dite, ne contiendrait-il pas une autre substance qui lui serait très particulière, dont l'influence serait essentielle et qui différerait beaucoup de celles qu'on a jusqu'à présent décelées dans les sérum ? Cette hypothèse ne s'est pas présentée à l'esprit d'Ehrlich et Sachs, qui n'attribuent au sérum de bœuf d'autre caractère que celui de posséder une sensibilisatrice. Pour élucider la question, il faut évidemment s'arranger de manière à mettre complètement hors de cause le pouvoir sensibilisateur que le sérum de bœuf peut manifester. Il faut, en d'autres termes, imaginer une expérience telle, que

cette sensibilisatrice non seulement soit dispensée d'entrer en jeu, mais même soit empêchée d'intervenir. Il faut non seulement qu'elle ne doive plus, mais même qu'elle ne puisse plus participer à la réaction. Si, dans de telles conditions, le sérum de bœuf 56°, en présence d'alexine de cheval, provoque encore l'hémolyse de globules qu'il ne sensibilise sûrement point, il faudra bien admettre alors que ce sérum de bœuf contient autre chose qu'une sensibilisatrice, qu'il possède réellement une substance insoupçonnée jusqu'ici, et dont le rôle dans l'expérience est capital.

Or, il est facile de réaliser ce desideratum. Il suffit de soumettre, à l'action du mélange sérum de bœuf + sérum frais de cheval, non plus des globules de cobaye, mais des globules de bœuf traités au préalable par une sensibilisatrice active (par exemple du sérum, chauffé à 56°, de lapin immunisé contre les globules de bœuf) dont l'excès est enlevé ensuite par lavage à la solution physiologique.

Il est clair que dans ces conditions le sérum de bœuf 56° n'est plus requis d'opérer la sensibilisation des globules, puisque celle-ci est déjà obtenue. Il est clair, en outre, qu'il ne saurait d'ailleurs la réaliser : personne, en effet, n'imaginera que le sérum de bœuf soit capable de sensibiliser des globules de bœuf, et qui plus est, provenant du même animal.

Prenons donc des globules de bœuf sensibilisés par du sérum, chauffé à 56°, de lapin immunisé contre le sang de bœuf (sérum lapin antibœuf). Si nous les additionnons de sérum alexique de cheval, l'hémolyse, on le sait, n'apparaît pas, et l'on ne constate pas non plus d'agglutination¹. Mais additionnons-les à la fois de sérum frais de cheval et de sérum de bœuf 56°. On trouve alors qu'au bout de quelques minutes, les globules s'agglutinent énergiquement; cette agglomération est suivie d'une hémolyse dont la marche est un peu lente et pénible, mais qui néanmoins est des plus manifestes.

Voici le détail de l'expérience : on sensibilise du sang de bœuf (préalablement lavé à la solution physiologique de NaCl et ramené à son volume primitif) par trois volumes de sérum

1. Il faut remarquer que le traitement préalable des globules par le sérum lapin antibœuf, qui les sensibilise, ne les agglutine presque pas. Bien que fortifiant sensibilisateur, ce sérum n'agglutine que faiblement les globules, qui, par agitation, se dissocient ensuite complètement.

lapin antibœuf 56°. Deux ou trois heures après, on enlève l'excès de sensibilisatrice par addition d'un grand volume de solution physiologique, centrifugation et décantation du liquide surnageant. Au sédiment de globules on ajoute de la solution physiologique de manière à obtenir une émulsion contenant 20/0/0 de sang. On introduit dans des tubes les liquides suivants :

- 1^o Sérum frais de cheval, 0,3 c. c. ;
- 2^o Sérum de bœuf 56°, 0,3 c. c. ;
- 3^o Sérum frais de cheval, 0,3 c. c.; sérum de bœuf 56°, 0,3 c. c.

On ajoute alors aux 3 tubes 0,3 c. c. d'émulsion de globules de bœuf sensibilisés. Résultat : pas d'agglutination ni d'hémolyse, même le jour suivant, dans les mélanges 1 et 2. Agglutination rapide et intense dans le tube 3, suivie d'hémolyse.

Voilà un résultat assez inattendu et même paradoxal, inconciliable, semble-t-il, avec les notions courantes relatives aux propriétés des sérum. Que les globules sensibilisés de bœuf restent intacts en présence d'alexine de cheval, on se l'explique aisément, on peut concevoir en effet que certaines espèces animales possèdent une alexine peu puissante, assez impropre à l'hémolyse. Mais qu'il suffise, pour provoquer la destruction des globules, d'ajouter à ce mélange le sérum précisément qui semble devoir être le plus inerte, c'est-à-dire le sérum d'espèce animale identique à celle qui a fourni les globules en expérience, sérum qui en outre a été chauffé à 56° et a été privé ainsi de son alexine, cela paraît bizarre. Fait aussi surprenant, l'agglutination observée nécessite le concours des deux sérum, qui, isolément, n'agglomèrent pas les hématoïdes !

On saisit immédiatement l'analogie entre cette expérience et celle d'Ehrlich et Sachs : les globules de cobaye qui restent intacts soit dans le sérum de bœuf 56°, soit dans l'alexine de cheval, se détruisent dans le mélange des deux sérum. Dans l'exemple ci-dessus, les globules de bœuf sensibilisés se comportent de la même façon. Au point de vue de l'agglutination, il y a encore similitude complète. Il est donc très probable que les deux expériences sont justiciables d'une interprétation commune. Et il est dès à présent certain que celle d'Ehrlich et Sachs doit être abandonnée.

On ne supposera pas, en effet, que le sérum de bœuf renferme un anbocepteur capable de s'attacher, d'une part au globule de même espèce (de bœuf) de l'autre à l'alexine (complément) de cheval, mais qui a besoin, pour se souder à l'hématie, d'avoir tout d'abord fixé le complément. Cette hypothèse invraisemblable s'élimine d'ailleurs immédiatement en présence des résultats expérimentaux que donne l'analyse intime du phénomène. Pour élucider celui-ci, il convient de disséquer l'expérience ci-dessus relatée, en considérant successivement les différents facteurs qui y participent.

a) Tout d'abord, est-il nécessaire, pour obtenir l'agglutination et l'hémolyse des globules de bœuf en présence de sérum de cheval et de sérum de bœuf 56°, que ces hématies aient été sensibilisées? Versons dans un tube 0,3 c. c. de chaque sérum et ajoutons 0,5 c. c. d'une émulsion à 20 0/0 de globules qui n'ont pas subi le contact préalable du sérum lapin antibœuf. Le résultat est négatif, les globules ne présentent aucun changement. L'expérience montre donc que pour être agglutinés et détruits, les globules doivent avoir été sensibilisés, et que l'anbocepteur nécessaire, actif sur le globule de bœuf, n'existe pas (contrairement à ce qu'exigerait l'idée d'Ehrlich et Sachs) dans le sérum de bœuf. L'expérience montre aussi d'ailleurs que le sérum de cheval n'est pas non plus nettement sensibilisateur pour l'hématie de bœuf.

b) La présence d'alexine dans le mélange est naturellement nécessaire à l'hémolyse; mais est-elle également indispensable à l'agglutination? A 0,5 c. c. d'émulsion de globules sensibilisés, ajoutons 0,3 c. c. de sérum de bœuf 56° et 0,3 c. c. de sérum de cheval qui cette fois a été chauffé à 56°. Pas d'hémolyse ni d'agglutination. L'expérience répond donc affirmativement.

c) Le sérum de cheval se borne-t-il à apporter de l'alexine, ou fournit-il en outre le principe qui préside à l'agglutination? S'il n'intervient que par son alexine, il est clair qu'on pourra le remplacer, avec le même résultat, par une alexine différente, par exemple par du sérum frais de lapin neuf. Tel est réellement le cas, ainsi que le montre l'expérience: versons dans deux tubes 0,5 c. c. d'émulsion de globules sensibilisés; ajoutons au premier 0,2 c. c. d'alexine de lapin; au second, 0,2 c. c.

d'alexine de lapin et 0,3 c. c. de sérum de bœuf 56°. Naturellement les globules s'hémolysent dans les deux tubes, l'alexine de lapin étant énergiquement hémolytique pour les globules sensibilisés. Mais l'hémolyse est précédée dans le second tube, et non dans le premier, d'une agglutination intense. Un témoin montre que le second tube n'aurait présenté ni agglutination, ni hémolyse, si on y avait introduit, au lieu de globules sensibilisés, de l'émulsion d'hématies non traitées au préalable par le sérum lapin antibœuf. C'est donc le sérum de bœuf et non celui de cheval qui fournit le principe agglutinant, mais, comme nous le savons déjà, l'agglutination ne peut s'opérer que si les globules sont impressionnés non seulement par une sensibilisatrice, mais encore par une alexine, qui peut indifféremment être celle de cheval, celle de lapin, ou même, comme nous allons le voir, celle du bœuf lui-même.

Introduisons dans deux tubes 0,2 c. c. de sérum non chauffé et récemment obtenu, de bœuf. Ajoutons au premier tube 0,5 c. c. d'émulsion de globules de bœuf normaux, non sensibilisés, au second 0,5 c. c. de globules de bœuf sensibilisés par action préalable du sérum lapin antibœuf. On constate que les globules subissent dans le second tube une agglutination rapide et forte, rien de pareil n'apparaît dans le premier mélange.

Nous voyons donc, en résumé, qu'en présence d'alexine (de provenance quelconque) le sérum de bœuf agglutine les globules de même espèce (et qui plus est, du même animal) pourvu que ceux-ci soient sensibilisés. Lorsque l'alexine en jeu ne possède de par sa nature qu'une médiocre aptitude à opérer l'hémolyse (comme c'est le cas pour l'alexine de cheval), on trouve que sa tâche est facilitée et s'accomplit mieux grâce à l'influence additionnelle du sérum de bœuf; celui-ci, en d'autres termes, non seulement agglutine les globules sensibilisés déjà touchés par l'alexine, mais encore modifie ces hématies de manière à favoriser l'action d'une alexine qui sans lui eût été impuissante. C'est pourquoi les globules de bœuf sensibilisés, qui n'éprouvent aucun changement dans l'alexine de cheval, s'agglutinent et s'hémolysent dans l'alexine de cheval additionnée de sérum de bœuf 56°¹.

1. Nous ne disons pas, faisons-le remarquer immédiatement, que c'est *parce qu'il* les agglutine que le sérum de bœuf rend les globules plus accessibles à

Le sérum de bœuf rend les globules de bœuf plus aisément destructibles par l'alexine de cheval ; on pourrait dire, somme toute, qu'il les sensibilise. Mais il va de soi que nous éviterons d'employer ce langage, susceptible de créer une confusion, car il pourrait faire supposer que le sérum de bœuf contient une sensibilisatrice véritable active sur les globules de bœuf. On pourrait sans doute parler ainsi en prenant ce terme de sensibilisatrice dans son acception tout à fait générale (à ce compte-là, toute influence favorisant la tâche de l'alexine, par exemple un léger abaissement de la teneur saline, pourrait être aussi qualifiée de sensibilisatrice), mais on sait bien que ce mot a été réservé par l'un de nous pour désigner des anticorps connus depuis longtemps déjà (fixateurs de Metchnikoff, ambocepteurs d'Ehrlich) et qui d'ailleurs se distinguent absolument de la substance actuellement considérée dans le sérum de bœuf. En effet, les sensibilisatrices proprement dites ne s'attaquent pas aux globules de même animal (ce que fait la substance en jeu dans le sérum de bœuf) et d'autre part les globules qu'elles impressionnent n'ont pas besoin, pour subir leur influence et pour les absorber, d'avoir déjà ressenti l'action d'une autre sensibilisatrice et aussi d'une alexine. Un motif semblable s'oppose de même — on le conçoit sans qu'il soit nécessaire d'insister — à ce qu'on assimile ce principe propre au sérum de bœuf — principe qui pourtant agglutine — aux agglutinines ordinaires.

Nous ne voyons, pour expliquer l'activité si particulière du sérum de bœuf, qu'une interprétation rationnelle ; afin d'être plus clairs, nous l'énoncerons immédiatement, en réservant pour les pages suivantes la vérification expérimentale qu'elle comporte : il existe dans ce sérum une matière spéciale, résistant au chauffage à 56° (et qui, ajoutons-le, se conserve pendant de longs mois dans ce sérum chauffé), de nature vraisemblablement albuminoïde et colloïdale, qui ne manifeste point de tendance à s'accorder aux globules aussi longtemps qu'ils sont normaux, mais qui se précipite sur les globules déjà chargés de

l'action de cette alexine par elle-même peu hémolytique. Nous disons : le sérum de bœuf rend les globules plus accessibles à cette action alexique, et en outre il produit en eux un changement très visible, l'agglutination. Ce n'est pas le fait d'être agglomérés en gros amas qui par lui-même crée la réceptivité inusitée des globules pour l'alexine ; nous reviendrons sur ce point.

sensibilisatrice et d'alexine. Il s'agit, pensons-nous, d'un phénomène de véritable collage, d'absorption dépendant de l'adhésion moléculaire. On conçoit qu'il n'y ait pas, au point de vue des propriétés d'adhésion moléculaire, identité entre des globules normaux et le complexe résultant de la superposition du globule, de la sensibilisatrice et de l'alexine, ce complexe pouvant attirer à lui et entraîner par adhérence la matière du sérum de bœuf, le globule primitif et pur ne possédant pas ce pouvoir. Le collage mutuel de cette matière et des globules sensibilisés et chargés d'alexine a pour effet de provoquer l'agglomération des hématies en volumineux paquets, et d'autre part de créer chez celles-ci une modification qui les rend (l'expérience le montre) plus hémolysables par des alexines d'activité médiocre.

Pour abréger, appelons désormais « colloïde du bœuf » cette matière du sérum de bœuf qui se précipite sur les globules sensibilisés et alexinés.

Avant de rechercher si l'interprétation ci-dessus énoncée se vérifie dans ses conséquences, appliquons-la à l'hémolyse des globules de cobaye ; ce sont en effet ces hématies qui interviennent dans l'expérience d'Ehrlich et Sachs que nous devons expliquer. Pour rendre moins brusque la transition entre celle-ci et les expériences relatées dans les pages précédentes, considérons pour commencer des globules de cobaye sensibilisés comme l'étaient tout à l'heure nos globules de bœuf, c'est-à-dire qui ont subi le contact de sérum spécifique anticobaye (sérum, chauffé à 56°, de lapin immunisé contre le sang de cobaye).

Ces globules sensibilisés de cobaye s'hémolysent dans le sérum frais (alexine) de cobaye ; toutefois (notamment en raison de ce fait que l'alexine provient de la même espèce que les globules) l'hémolyse observée pourra être assez lente, surtout si la dose d'alexine mise en œuvre est minime. Dans ces conditions, et par analogie avec ce que nous avons constaté antérieurement à propos des globules sensibilisés de bœuf, l'addition de sérum de bœuf 56° devra exercer sur l'hémolyse une influence nettement accélératrice. D'autre part, l'addition de ce sérum aux globules sensibilisés et mélangés à l'alexine devra provoquer l'agglutination énergique de ces hématies. En d'autres

termes, le colloïde interviendra et se précipitera sur les globules lorsque ceux-ci sont sensibilisés et alexinés.

L'expérience confirme entièrement ces prévisions. A vrai dire, avant même qu'on introduise le sérum de bœuf, les globules sensibilisés sont déjà visiblement agglutinés par leur contact préalable avec le sérum lapin anticobaye ; mais dès qu'on les additionne d'un peu d'alexine et de sérum de bœuf 56°, l'agglutination, jusqu'alors peu intense, devient considérable, toutes les hématies se rassemblent en quelques paquets glaireux qui bientôt se décolorent. En l'absence d'alexine, le sérum de bœuf ne provoque nullement cette agglutination énergique des globules sensibilisés : nous le répétons, le colloïde du bœuf n'est entraîné par les globules que quand ceux-ci sont traités à la fois par la sensibilisatrice et l'alexine. L'analogie est donc complète entre l'expérience antérieure, portant sur les globules de bœuf sensibilisés, et celle dont il est question en ce moment, et dont voici le détail : ¹.

On répartit dans des tubes les liquides suivants :

1. Alexine de cobaye 0,1 c.c.; sérum bœuf 56°, 0,3 c.c.
2. Sérum lapin anticobaye (chauffé à 56°) 0,15 c.c.; sérum bœuf 56°, 0,3 c.c.

3. Alexine de cobaye 0,1 c.c.; sérum lapin anticobaye 56°, 0,15 c.c.; sérum bœuf 56°, 0,3 c.c.

4. Alexine de cobaye 0,1 c.c.; sérum lapin anticobaye 56°, 0,15 c.c.

5. Sérum lapin anticobaye 0,15 c.c.

On ajoute ensuite à tous les tubes 0,5 c.c. d'émulsion à 5% de sang de cobaye (préalablement lavé) dans la solution physiologique. Les mélanges sont maintenus à la température du laboratoire.

Résultats : Le mélange 3, où le sérum de bœuf agit sur les globules sensibilisés et alexinés, présente en quelques instants une agglutination extrêmement forte, et l'hémolyse y est complète au bout de 10 minutes. Le mélange 4, identique au 3 sauf qu'il ne contient pas de sérum de bœuf, ne s'agglutine que

1. Nous devons faire remarquer que le sérum lapin-anticobaye utilisé dans cette expérience a été obtenu par injection, à des lapins, de globules de cobaye débarrassés de sérum par un lavage soigné. Ce sérum anticobaye n'était ni précipitant, ni anti-alexique, pour le sérum de cobaye; s'il l'avait été, l'expérience aurait pu être viciée par neutralisation de l'alexine de cobaye dans 3 et 4.

légèrement, et l'hémolyse y est encore incomplète au bout d'une heure. Tubes 2 et 5 (sans alexine). agglutination faible, pas d'hémolyse. Dans le tube 4, contenant de l'alexine mais pas de sensibilisatrice lapin anticobaye, les globules ne s'agglutinent guère; ils ne subissent qu'une hémolyse lente, partielle encore le jour suivant, et due à ce que, comme nous l'avons dit plus haut, le sérum de bœuf 56° possède une sensibilisatrice à l'égard des globules de cobaye, mais dont la puissance est médiocre¹.

Le fait que le sérum de bœuf 56° agit de la même façon (par collage du colloïde), sur les globules sensibilisés et alexinés, soit de bœuf, soit de cobaye, étant désormais bien acquis, il nous est maintenant très facile de comprendre l'expérience d'Ehrlich et Sachs. Il suffit en effet, pour qu'elle s'explique exactement comme les expériences précédentes, d'admettre que dans le mélange de ces auteurs (sérum frais de cheval + sérum de bœuf 56°) les globules de cobaye se chargent de sensibilisatrice et d'alexine, devenant ainsi capables d'entrainer le colloïde, lequel provoque l'agglutination et facilite beaucoup l'hémolyse.

Quel est des deux sérums celui qui opère la sensibilisation ? Nous avons vu que le sérum de bœuf 56° lui-même possède une sensibilisatrice, puisque son introduction dans un mélange de globules et d'alexine de cobaye provoque une hémolyse bien visible. Cette sensibilisatrice peut donc intervenir dans une certaine mesure. Mais elle n'est pas indispensable, car Ehrlich et Sachs ont vu que le sérum de bœuf 56° qui a subi le contact préalable de globules de cobaye (et nous savons que ce traitement dépoille le sérum de la sensibilisatrice active sur ces hématies, ce qui est du reste conforme à la règle générale) a

1. Le mélange contient de l'alexine, mais les globules, sensibilisés uniquement par le sérum de bœuf 56° (et non par la sensibilisatrice lapin anticobaye, qui est beaucoup plus puissante), ne sont pas suffisamment impressionnés ni assez chargés d'alexine pour pouvoir entraîner le colloïde avec beaucoup d'énergie ; toutefois, comme on le verra plus loin, ce dernier subit dans ce cas une absorption, de nature à favoriser l'hémolyse, mais qui reste très minime.

Il faut remarquer que la faiblesse de la sensibilisatrice du sérum de bœuf 56° est peut-être due à l'influence du chauffage. Cette matière active paraît en effet plus puissante dans le sérum de bœuf qui n'a pas été chauffé. En effet, les globules de cobaye s'agglomèrent très énergiquement dans le sérum de bœuf frais, ce qui montre qu'ils y entraînent le colloïde ; ils y sont donc fortement sensibilisés et sont aussi, bien entendu, alexinés, le sérum de bœuf frais fournissant à la fois la sensibilisatrice et l'alexine nécessaires pour que les globules puissent absorber le colloïde ; on observe ensuite l'hémolyse.

gardé presque intact son pouvoir de communiquer au sérum frais de cheval le pouvoir hémolytique. Mais l'on conçoit fort bien pourquoi la sensibilisatrice de bœuf n'est pas nécessaire. En effet, une autre sensibilisatrice, d'une activité très réelle, intervient encore dans l'expérience d'Ehrlich et Sachs. C'est celle du sérum de cheval frais¹, lequel fournit en outre l'alexine nécessaire à l'hémolyse.

Notre interprétation de l'expérience d'Ehrlich et Sachs est donc la suivante : introduits dans le mélange des deux séums, les globules de cobaye sont impressionnés par la sensibilisatrice du sérum de cheval, et aussi dans une certaine mesure par celle du sérum de bœuf 56°. Mais celle-ci est superflue pour la simple raison qu'elle fait double emploi avec la précédente : on peut donc l'éliminer au préalable sans que le résultat expérimental soit changé ; en son absence, le sérum de cheval suffit à assurer la sensibilisation. Celle-ci réalisée, les globules sont aptes à fixer également l'alexine de cheval. Celle-ci ne possède qu'un pouvoir hémolytique peu accusé. Mais les globules étant sensibilisés et chargés d'alexine, étant par ce fait même modifiés dans leurs propriétés d'adhésion moléculaire, sont désormais capables d'entraîner le colloïde du sérum de bœuf, qui se précipite sur eux. L'adjonction de cette nouvelle matière produit deux effets : elle rend les hématies plus destructibles par l'alexine, elle les agglutine fortement. On observe en conséquence une aggrégation énergique suivie d'hémolyse.

Cette interprétation explique les particularités notées par Ehrlich et Sachs. On conçoit en effet que :

a) Le sérum de bœuf 56° traité par des globules de cobaye conserve le pouvoir de constituer, avec le sérum de cheval, un mélange hémolytique. En effet, les globules de cobaye peuvent dépouiller le sérum de bœuf de sa sensibilisatrice (laquelle n'est pas nécessaire, le sérum de cheval en possédant une également) mais non de colloïde, dont l'intervention est indispensable. En effet celui-ci n'est absorbé que si les globules sont chargés à la fois de sensibilisatrice et d'alexine.

b) Les globules de cobaye que nous venons de considérer,

1. Rappelons qu'on dénote aisément la présence d'une sensibilisatrice dans ce sérum. En effet les globules de cobaye s'hémolysent lorsqu'on les additionne d'alexine de cobaye et de sérum de cheval.

et qui, traités par le sérum de bœuf, en ont fixé la sensibilisatrice (mais non le colloïde) ne s'hémolysent pas si, après les avoir débarrassés par centrifugation de l'excès de sérum de bœuf, on les plonge dans l'alexine de cheval. En effet, les globules dans ce dernier sérum se sensibilisent et se chargent d'alexine, mais ils ne peuvent absorber le colloïde, celui-ci ayant été enlevé auparavant par la centrifugation et éliminé de l'expérience.

* *

Les expériences antérieures, notamment celles qui mettent en jeu les globules de bœuf, ayant démontré que l'interprétation d'Ehrlich et Sachs, formulée d'ailleurs par ces savants sous l'empire d'idées purement théoriques et préconçues, ne saurait être acceptée, nous croyons inutile de la considérer davantage. Mais il convient de vérifier l'exactitude de l'explication que nous venons de proposer.

1^o Nous admettons tout d'abord que l' entraînement du colloïde de bœuf par les globules s'opère lorsque ceux-ci sont modifiés par la fixation de la sensibilisatrice et de l'alexine. Si cette proposition est vraie, on doit prévoir que des globules sensibilisés et traités par l'alexine, mais qu'on a soin de laver ensuite soigneusement à la solution physiologique pour les débarrasser de l'excès de ces substances actives, et qu'on introduit ensuite dans le sérum de bœuf 56°, absorberont le colloïde; en d'autres termes, la fixation de ce dernier n'exige pas la présence d'un excès d'alexine libre.

L'agglomération des globules étant un symptôme très visible dénotant l' entraînement du colloïde, les globules sensibilisés, alexinés, lavés ensuite, devront s'agglutiner énergiquement lorsqu'on les transporte dans le sérum de bœuf.

La technique de l'expérience exige que les globules sensibilisés ne se détruisent pas lors du contact avec l'alexine; prenons donc de l'alexine de cheval, qui est peu ou pas hémolytique.

Préparons une émulsion à 10 0/0 dans la solution physiologique de sang de bœuf sensibilisé (et lavé comme d'habitude) par contact avec du sérum lapin antibœuf 56°, et, d'autre part, de l'émulsion à 10 0/0 de sang de bœuf non sensibilisé. Intro-

duissons dans trois larges tubes à centrifuge les liquides suivants :

- a) Émulsion de globules sensibilisés 1 c. c.; sérum frais de cheval 0,3 c. c.
- b) Émulsion de globules sensibilisés 1 c. c.; sérum de cheval préalablement chauffé à 56°, 0,3 c. c.
- c) Émulsion de globules non sensibilisés 1 c. c.; sérum frais de cheval 0,3 c. c.

Une demi-heure après, on remplit les tubes d'eau physiologique, on centrifuge et décante, on répète ce lavage; après la seconde décantation, on verse sur les sédiments de globules 1 c. c. de solution physiologique et 0,4 c. c. de sérum de bœuf 56°. Résultat : pas d'agglutination dans les tubes *b* et *c*, agglutination forte et presque instantanée dans le tube *a*.

2^e Nous disons que le colloïde est entraîné par les globules sensibilisés et alexinés. S'il en est ainsi, du sérum de bœuf 56°, mis en contact avec ces globules, débarrassé ensuite des hématies par centrifugation, ne doit plus agglutiner de nouveaux globules pareillement préparés. C'est ce que l'expérience vérifie. Du sang de bœuf fortement sensibilisé (par le sérum lapin antibœuf) est, après lavage, ramené à son volume primitif, puis mélangé à trois parties de sérum frais de cheval. Après 2 heures environ, on lave encore, on ramène au volume primitif, et on additionne ce sang sensibilisé et alexiné de partie égale de sérum de bœuf 56°. On constate qu'après ce contact, le sérum de bœuf a perdu sinon la totalité, au moins la plus grande partie de son colloïde ¹.

3^e Ce sérum de bœuf dépouillé par ce procédé d'une grande partie de son colloïde, ne devra plus manifester qu'une activité médiocre, nettement inférieure à celle du sérum intact, quand on le met en présence de sérum frais de cheval et de globules de cobaye, c'est-à-dire quand on l'emploie pour réaliser l'expérience d'Ehrlich et Sachs, dans laquelle, d'après nous, le colloïde intervient à titre essentiel. On constate, en effet, que, sous l'influence d'un pareil sérum de bœuf, appauvri en colloïde, l'agglutination et l'hémolyse des globules de cobaye sont

1. Remarquons à ce propos qu'il suffit de très petites doses de colloïde pour agglutiner les hématies sensibilisées et alexinées. Il faut donc que le sérum soit complètement épuisé en colloïde pour qu'il ne manifeste plus aucune activité.

beaucoup plus faibles et plus lentes que si l'on fait intervenir une dose correspondante de sérum de bœuf 56° normal ou de sérum de bœuf traité antérieurement par des globules de cobaye et qui a perdu ainsi sa sensibilisatrice mais non son colloïde.

4° Le colloïde n'est absorbé et n'est par conséquent capable de provoquer l'agglutination que si les globules sont non seulement sensibilisés, mais aussi alexinés. Or, dans l'expérience d'Ehrlich et Sachs, c'est évidemment le sérum de cheval qui fournit l'alexine. Il faut prévoir, en conséquence, que si on mélange des globules de cobaye et du sérum de bœuf 56° à du sérum de cheval qui a subi antérieurement le contact de globules sensibilisés quelconques, et a été ainsi dépoillé de son alexine, ces globules de cobaye ne présenteront ni hémolyse, ni agglutination. Or, l'expérience confirme entièrement ces prévisions.

On sensibilise du sang de bœuf (lavé) par trois volumes de sérum lapin bœuf 56°. Après lavage, on ramène le sang à son volume primitif (en ajoutant la quantité voulue de solution physiologique au sédiment de globules) et on le mélange à volume égal de sérum frais de cheval. Après un contact assez long, on centrifuge, on décante le liquide surnageant qui représente du sérum de cheval épuisé de son alexine. Pour obtenir un sérum témoin bien comparable, on procède exactement aux mêmes manipulations, sauf qu'on met cette fois du sérum de cheval en contact avec des globules de bœuf non sensibilisés. Le liquide surnageant décanté représente donc du sérum de cheval non épuisé de son alexine. On prépare les mélanges suivants :

a) Émulsion de globules de cobaye à 3 0/0 dans la solution physiologique 1 c. c.; sérum de bœuf 56°, 0,3 c. c.; sérum épuisé de cheval 0,6 c. c.

b) Émulsion de globules 1 c. c.; sérum de bœuf 56°, 0,3 c. c.; sérum non épuisé de cheval 0,6 c. c.

c) Émulsion de globules 4 c. c.; sérum de bœuf 56°, 0,3 c. c.; mélange à parties égales de solution physiologique et de sérum intact de cheval, 0,6 c. c.

Résultat : l'agglutination apparaît rapidement dans *b* et *c*, et est bientôt suivie d'hémolyse. Pas d'agglutination ni d'hémolyse dans *a*.

La même expérience, réalisée avec des globules de bœuf

sensibilisés au lieu de globules de cobaye, donne le même résultat.

Signalons en passant que cette expérience fournit une preuve encore de l'unité fonctionnelle de l'alexine. En effet, le sérum de cheval, épuisé d'alexine par les globules de bœuf, ne manifeste plus d'activité alexique envers les globules de cobaye. Les deux espèces de globules sont donc sensibles et combinables à la même alexine.

5^o Nous admettons que dans l'expérience d'Ehrlich et Sachs, le sérum frais de cheval non seulement fournit l'alexine aux globules de cobaye, mais encore intervient à titre prédominant pour les sensibiliser. Des globules de cobaye qu'on a mis en contact simplement avec du sérum frais de cheval, qu'on lave ensuite pour les débarrasser de l'excès de ce sérum, seront donc à la fois sensibilisés et alexinés et par conséquent aptes à fixer le colloïde : ils devront donc s'agglutiner énergiquement dès qu'on les aura introduits ensuite dans le sérum de bœuf 56°, tandis que des globules normaux de cobaye ne présenteront dans ce liquide aucun changement. C'est, en effet, ce que l'on constate. On constate bien entendu aussi que si l'on fait subir aux globules le traitement inverse, c'est-à-dire si on les met d'abord en contact avec le sérum de bœuf 56°, puis, après lavage, avec le sérum de cheval, aucune agglutination n'apparaît.

a) Emulsion de globules de cobaye à 10 0/0 dans la solution physiologique 1 c. c.

b) Emulsion de globules 1 c. c.; sérum frais de cheval 0,3 c. c.

c) Emulsion de globules 1 c. c.; sérum de bœuf 56°. 0,3 c. c.

Une heure après, on remplit les tubes de solution physiologique, on agite, on centrifuge et décante. Aux sédiments de globules, on ajoute 1 c. c. de solution physiologique, on agite, puis on introduit dans *a* et *b* 0,3 c. c. de sérum de bœuf 56°, dans *c* 0,3 c. c. de sérum frais de cheval. Résultat : agglutination intense et presque immédiate dans *b*; rien de pareil dans *a* et *c*.

6^o Il résulte de ce qui précède, que du sérum de cheval mis en contact avec des globules de cobaye doit s'appauvrir en sensibilisatrice active sur ces éléments, ainsi qu'en alexine, et doit, par conséquent, perdre le pouvoir de constituer ensuite,

avec le sérum de bœuf 56°, un mélange agglutinant et hémolytique pour de nouveaux globules de cobaye. Ce fait de l'épuisement du sérum de cheval par contact préalable avec les hématies de cobaye se vérifie aisément, ainsi que M. Klein l'a déjà constaté¹. Il est d'ailleurs absolument inconciliable avec l'interprétation d'Ehrlich et Sachs. Mais ici se place un fait dont il convient d'être averti, pour que cette constatation soit possible. L'absorption des substances actives du sérum de cheval s'opère parfaitement si ce sérum est mélangé à la quantité voulue de globules en émulsion, c'est-à-dire dilués dans un volume assez grand de solution physiologique. Mais si le sérum agit sur les globules à l'état concentré, c'est-à-dire si la solution physiologique est éliminée de l'expérience. (si par exemple on verse le sérum sur un sédiment de globules obtenu par centrifugation de l'émulsion et décantation de la solution physiologique surnageante) alors l'absorption reste incomplète et le sérum, malgré le contact, garde en grande partie ses propriétés premières. Cette remarque a été faite également par M. Klein. Soit dit en passant, elle montre que la fixation des principes actifs d'un sérum par les éléments sensibles peut être influencée par des causes minimes, dont l'intervention peut passer insoupçonnée, et que, par conséquent, l'emploi systématique de la méthode de l'absorption spécifique, si souvent usitée par Ehrlich et ses élèves, pour la discussion des problèmes d'hémolyse, peut conduire à des conclusions erronées. Dans l'exemple en question, on pourrait en effet être amené, suivant que le mélange sérum-globules contient ou non un peu de solution physiologique (et ce détail dans le mode opératoire semble à première vue n'avoir aucune importance) à conclure que les globules possèdent des récepteurs pour les substances actives du sérum de cheval, ou bien qu'ils n'en ont pas. L'un de nous, ainsi que M. Landsteiner, a d'ailleurs formulé déjà toute une série de réserves à propos des conclusions déduites des expériences fondées sur cette méthode de l'absorption spécifique. Citons l'expérience suivante :

Tube a). Sérum frais de cheval 0,4 c. c.; sang de cobaye

1. Ueber die Beeinflussung des hämolytischen Komplements durch Agglutination und Präzipitation. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1905, n° 48.

(lavé) en émulsion à 40 % dans la solution physiologique 1 c. c. (1 c. c. renferme donc 0,4 de sang).

Tube *b*). Sérum frais de cheval 0,4 c. c.; sédiment de globules de cobaye provenant de 1 c. c. de l'émulsion, la solution physiologique ayant été enlevée par centrifugation et décantation.

Après une heure de contact on centrifuge; les liquides surageants décantés *a* et *b* sont versés, *a* dans un tube *aa* contenant 0,05 c. c. de sang de cobaye non dilué, *b* dans un tube *bb* contenant cette dose de sang additionnée de 1 c. c. de solution physiologique. On ajoute ensuite aux tubes *aa*, *bb*, 0,4 c. c. de sérum de bœuf 56°. Résultat : pas d'agglutination ni d'hémolyse dans le tube *aa*; au contraire, dans le tube *bb*, agglutination et hémolyse presque aussi rapides et fortes que dans un mélange témoin constitué de 0,05 c. c. de sang, 1 c. c. de solution physiologique, 0,4 c. c. de sérum de cheval, 0,4 c. c. de sérum de bœuf 56°.

D'autre part, reprenons les tubes *a* et *b* au fond desquels se trouve un sédiment de globules. Versons-y 1 c. c. de solution physiologique et 1 c. c. de sérum de bœuf 56°. Les globules de *b* ne subissent qu'une agglutination presque imperceptible et lente : les globules de *a* s'agglutinent beaucoup plus fortement, absorbent donc mieux le colloïde, sont donc mieux sensibilisés et alexinés.

L'absorption des matières actives du sérum de cheval étant favorisée par la dilution dans un peu de solution physiologique, on trouve, corrélativement, que l'agglutination et l'hémolyse des globules de cobaye dans le mélange sérum de bœuf 56° + sérum de cheval s'effectuent plus aisément si le mélange contient une certaine dose de cette solution que s'il n'en renferme point.

7° Dans l'expérience d'Ehrlich et Sachs, la sensibilisation des globules est opérée essentiellement, nous l'avons dit, par le sérum de cheval. Or, celui-ci perd son alexine, mais doit, suivant toute vraisemblance, garder sa sensibilisatrice active sur l'hématie de cobaye, lorsqu'on le met en contact avec des globules sensibilisés de bœuf.

Il en résulte que si nous rendons ensuite, à ce sérum ainsi traité, de l'alexine, en l'additionnant d'un peu de sérum frais

de cobaye, il pourra de nouveau hémolyser les globules de cobaye et cette action sera très énergique si on fait intervenir en outre le sérum de bœuf 56°.

Pour rendre l'expérience plus démonstrative, on a soin de débarrasser au préalable ce dernier sérum de sensibilisatrice active sur les globules de cobaye, par contact avec ces hématies; il n'agit donc plus que par son colloïde, la seule sensibilisatrice entrant en jeu pour impressionner les globules de cobaye étant dès lors celle de cheval.

Conformément à ces données, on observe une hémolyse intense dans un mélange de globules de cobaye, de sérum de bœuf 56° (traité au préalable par volume égal de globules de cobaye), de sérum frais de cheval (traité au préalable par volume égal de globules de bœuf sensibilisés) et d'alexine de cobaye.

Des témoins appropriés montrent que dans ces conditions celle-ci est nécessaire, que d'autre part, en l'absence du sérum de bœuf, l'hémolyse opérée par le sérum traité de cheval additionné d'alexine de cobaye est considérablement plus lente, et qu'enfin, en l'absence du sérum de cheval, le sérum traité de bœuf mêlé à l'alexine de cobaye n'hémolyse pas.

8° Une dernière remarque se présente à propos de l'hémolyse des globules de cobaye sous l'influence d'alexine de cobaye et de sérum de bœuf 56°, qui, nous le savons, est capable de sensibiliser nettement ces hématies. Il est clair que dans un pareil mélange le colloïde peut intervenir dans une certaine mesure, les globules étant sensibilisés (pas très fortement il est vrai) capables par suite de fixer de l'alexine et aptes par conséquent à entraîner une certaine dose de colloïde. Or celui-ci tend à favoriser l'hémolyse.

Dans de telles conditions, les globules doivent donc se détruire plus activement que si, opérant d'une manière un peu différente, on avait tout d'abord mêlé les globules au sérum de bœuf pour les sensibiliser, lavé ensuite ces hématies et introduit finalement celles-ci dans l'alexine de cobaye.

En effet, en procédant de cette manière, on supprime l'absorption du colloïde par les globules sensibilisés et alexinés. Or, conformément à cette prévision, l'expérience montre que l'hémolyse s'opère beaucoup mieux si le sérum de bœuf est

maintenu au contact des globules et de l'alexine, que si on le mélange aux globules, mais qu'on l'élimine ensuite avant d'introduire le sérum frais de cobaye.

Bien entendu, on n'observe aucune particularité de ce genre dans l'hémolyse des globules (additionnés d'alexine) sous l'influence du sérum de cheval. Celui-ci en effet agit uniquement grâce à une sensibilisatrice, et ne présente point, en conséquence, les singularités que le sérum de bœuf doit à son colloïde.

L'interprétation que nous avons proposée pour rendre compte de l'expérience d'Erlich et Sachs rencontre donc régulièrement la confirmation expérimentale. Il est toutefois un fait qui au premier abord semble être en désaccord avec notre explication.

Quand on traite des globules de cobaye par un volume suffisant de sérum de cheval frais, qu'on les lave et les plonge ensuite dans le sérum de bœuf 56°, on observe, nous l'avons vu, une agglutination très énergique due à l'absorption du colloïde par les globules sensibilisés et alexinés. Mais on devrait observer aussi, semble-t-il, une hémolyse active, les globules ayant fixé de l'alexine dont l'influence délétère doit être favorisée par l'adjonction du colloïde. Or, l'hémolyse qu'on observe dans ces conditions est lente et légère, tandis que l'agglutination est extraordinairement rapide et forte.

Remarquons tout de suite que dans ces conditions l'alexine et le colloïde sont fixés successivement à des moments séparés par un intervalle assez long. Il est probable que, l'alexine ayant agi longtemps, les propriétés d'adhésion moléculaire du globule sont modifiées au maximum, et l'absorption du colloïde est exagérée, de telle sorte que l'agglutination affecte une intensité inusitée.

Or, il existe une sorte d'antagonisme entre l'hémolyse et l'agglutination. Quand celle-ci est trop forte, les globules pour ainsi dire coagulés résistent remarquablement à l'influence alexique. Ce qui le démontre, et ce qui en même temps prouve d'une manière formelle que l'absence d'hémolyse dans le cas en question ne plaide nullement contre notre interprétation, c'est le résultat expérimental suivant :

Ces globules qui ont été en contact avec le sérum de cheval et qui subissent ensuite une agglutination extrêmement forte dans le sérum de bœuf 56°, résistent encore à l'hémolyse si on les introduit ultérieurement dans du sérum de cheval additionné de sérum de bœuf, si en d'autres termes on les plonge dans le mélange hémolytique pour des globules ordinaires. Ces globules très agglutinés ont donc acquis une résistance très supérieure à celle de globules normaux.

Bref, l'hémolyse, sous l'influence de ces substances diverses — sensibilisatrice, alexine, colloïde — est un phénomène assez contingent, auquel les divers facteurs doivent participer suivant certaines règles, et dont le mécanisme assez délicat peut être dérangé par de légères modifications dans la technique de l'expérience, et notamment dans le moment où chacune des substances intervient.

On peut d'ailleurs obtenir l'inverse, c'est-à-dire provoquer une hémolyse très active accompagnée d'une agglutination très faible. L'antagonisme se révèle cette fois en ce qu'une tendance trop forte à l'hémolyse nuit à l'énergie de l'agglutination.

Pour exagérer cette tendance à l'hémolyse, il suffit de préparer le mélange sérum de bœuf 56° + sérum de cheval en l'additionnant d'un peu d'alexine de cobaye. Par exemple dans un mélange de : émulsion de sang de cobaye à 5 0/0, 1 c. c., sérum de bœuf 56° 0,3 c. c., sérum de cheval 0,3 c. c., sérum frais de cobaye 0,3 c. c.. l'hémolyse s'opère plus rapidement que dans un mélange semblable sauf qu'il ne contient pas d'alexine de cobaye, mais l'agglutination y est nulle ou très faible, tandis qu'elle est forte dans le second mélange.

Hémolyse et agglutination ne sont donc pas inséparables ni nécessaires l'une à l'autre, ce sont vraisemblablement deux conséquences distinctes d'un même phénomène, l'absorption du colloïde par les hématies sensibilisées et qui se chargent d'alexine.

* * *

CONCLUSIONS

1^o Conformément aux données d'Ehrlich et Sachs, l'expérience montre que les globules de cobaye s'hémolysent dans le

mélange de sérum frais de cheval et de sérum de bœuf préalablement chauffé à 56°, tandis qu'ils résistent si on leur fait subir successivement le contact d'abord du sérum de bœuf, puis du sérum de cheval. Mais l'interprétation formulée à ce propos par Ehrlich et Sachs, et d'après laquelle la sensibilisatrice (fournie par le sérum de bœuf) ne s'unit au globule qu'à la condition de s'être combinée tout d'abord à l'alexine (apportée par le sérum frais de cheval) se compose d'affirmations inexactes. D'abord, la sensibilisatrice qui joue le rôle prépondérant et le plus nécessaire n'est pas celle du sérum de bœuf, mais bien celle du sérum de cheval. Ensuite, ces sensibilisatrices se comportent comme toutes leurs congénères, en ce sens qu'elles n'exigent pas, pour s'unir aux globules, la présence d'alexine. Enfin, cette interprétation laisse complètement dans l'ombre un facteur essentiel qui confère, au cas d'hémolyse en question, son allure remarquable et si particulière :

2^o Ce facteur, c'est l'intervention d'une matière spéciale, propre au sérum de bœuf, résistant au chauffage à 56° et à la conservation, de nature colloïdale et sans doute albuminoïde, qui jouit de la propriété d'être entraînée par les globules chargés de sensibilisatrice et d'alexine, tandis qu'elle reste libre en présence de globules normaux ou simplement sensibilisés. L'absorption de ce colloïde par les hématuries ainsi préparées a pour effet de les agglutiner énergiquement, et de les rendre, sauf dans certaines conditions particulières, plus accessibles à l'hémolyse. C'est pourquoi les globules de cobaye non seulement se détruisent (Ehrlich et Sachs) dans le mélange des sérumis de cheval et de bœuf, mais encore s'y agglomèrent en amas volumineux ;

3^o L'absorption du colloïde par les globules sensibilisés et alexinés est due très probablement à l'adhésion moléculaire, le traitement préalable ayant modifié ces globules pour ce qui concerne leurs propriétés d'adhésion. Dans ces conditions, cette absorption peut s'effectuer quelle que soit l'espèce animale d'où provient le globule, celui-ci pouvant d'ailleurs appartenir à l'animal lui-même (bœuf) qui fournit le colloïde ;

4^o L'intervention du colloïde explique les diverses particularités notées par Ehrlich et Sachs. Elle se manifeste encore de la façon la plus claire, dans les conditions signalées ci-

dessus, au cours d'expériences nombreuses destinées à mettre son rôle en évidence et en général à préciser le mode d'action des diverses influences en jeu dans l'agglutination et l'hémolyse observées ;

5° L'interprétation d'Ehrlich et Sachs étant reconnue fausse, on voit disparaître le seul argument qui semblait plaider sérieusement en faveur de la thèse soutenue par Ehrlich et son école, et d'après laquelle la sensibilisatrice possède un groupement atomique complémentophile, c'est-à-dire se combine directement à l'alexine. Il y a lieu en conséquence d'abandonner les termes ambocepteur et complément, qui sont l'expression de conceptions erronées.

DE L'ACTION DU STREPTOCOQUE ET DE SA LYSINE introduits par voie buccale

ET

de quelques questions qui s'y rattachent.

PAR LE Dr A. TCHITCHKINE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le présent travail, qui peut être envisagé comme la suite de nos recherches sur le bacille d'Eberth¹, avait primitivement pour but de savoir si le sang d'animaux ayant ingéré du streptocoque ou des produits streptococciques, exerce quelque action vis-à-vis de la streptocolysine.

Dès les premiers essais d'administration du streptocoque aux lapins, nous avons rencontré un obstacle qui nous a obligé de dévier de la voie que nous nous étions primitivement tracée. Cet obstacle consistait en ceci que presque aucun lapin ne survivait après l'ingestion des streptocoques et que presque tous mourraient quelques jours après, présentant les symptômes de la septicémie streptococcique.

Il était par conséquent nécessaire, avant tout, d'éclaircir le mécanisme de cette infection, c'est-à-dire de déterminer dans quelle partie du tube digestif, à commencer par la cavité buccale, et par quel processus, a lieu l'infection par le streptocoque vivant ; ensuite, comme nos expériences portaient aussi sur l'ingestion des cultures chauffées et de la streptocolysine, de regarder comment les lapins se comportent envers ces produits.

Commençons par l'exposé de nos expériences sur l'ingestion aux animaux du streptocoque vivant.

Le streptocoque dont nous nous sommes servi avait autrefois passé par le lapin. Au moment où nous commençons nos expériences il était assez affaibli pour ne tuer, à aucune dose, le lapin par injection sous-cutanée. Après avoir été inoculé successivement dans les veines de deux lapins, ce streptocoque faisait

1. De l'influence de l'ingestion des bactéries et des produits bactériens sur les propriétés du sérum sanguin. *Annales de l'Institut Pasteur*. T. XVIII, p. 576, '904.

périr les lapins qui ingéraient 6 à 7 c. c. d'une émulsion préparée en délayant une boîte entière de culture dans 20 c. c. de liquide physiologique. Quelques lapins furent ainsi tués par ingestion et le streptocoque acquit bientôt une virulence si grande, qu'une dose infiniment petite amenait la mort des lapins qui la recevaient sous la peau.

Nous en faisions des cultures sur gélose dans les boîtes de Roux. Une heure avant l'ensemencement, la surface de la gélose était humectée avec une petite quantité de sérum de cheval préalablement chauffé à 56° pendant une demi-heure. Nous employions d'ordinaire des cultures de 24 heures, chaque boîte étant à peu près équivalente à 20 cultures dans des tubes à essai. La couche de streptocoque était délayée ensuite avec de l'eau distillée et le microbe dilué était donné aux lapins.

Si, pendant plusieurs heures avant l'ingestion, on a mis les animaux au régime de la nourriture sèche, ils boivent très volontiers l'émulsion qu'on leur présente. Nous la donnions d'ordinaire directement par l'embout de la seringue, en introduisant l'instrument avec précaution dans la bouche. On peut ainsi faire ingérer exactement la quantité voulue de liquide, et de plus, l'opération s'exécute dans des conditions d'une parfaite propreté.

Après avoir essayé plusieurs doses assez fortes, nous donnions ensuite, dans la grande majorité des cas, soit 1/12, 1/8, 1/4, 1/2, jusqu'à 1 c. c. d'une seule culture en tube.

Dans les ingestions réitérées, nous augmentions d'ordinaire peu à peu la dose, sans pouvoir dépasser une culture, sauf de rares exceptions. Ces ingestions étaient espacées à peu près à une semaine d'intervalle.

Le résultat de ces ingestions, faites à 88 lapins, fut le suivant :

49	lap.	sont morts ap.	1	ingestion,	dont	42	du strept.	et	7	de causes étrangères.
16	—	—	2	ingestions	—	15	—	4	—	—
12	—	—	3	—	—	8	—	4	—	—
4	—	—	4	—	—	3	—	1	—	—
5	—	—	5	—	—	5	—	0	—	—
1	—	—	6	—	—	0	—	1	—	—
1	—	—	7	—	—	4	—	0	—	—
88						74		14		

Si nous exprimons ces résultats sous une autre forme, nous trouvons que, sur un total de 88 lapins, il en meurt :

Morts du streptocoque.	après 1 ingestion	48 0/0
	— 2 ingestions.....	17 0/0
	— 3 —	9 0/0
	— 4 —	3 0/0
	— 5 —	6 0/0
	— 7 —	4 0/0
	Morts de causes étrangères.....	16 0/0

En calculant sur la quantité totale des ingestions (171) et des morts causées par l'infection streptococcique (74), nous trouvons que la mort se produit dans 43 cas sur 100 (43 0/0).

La mort survient d'ordinaire de 1 à 6 jours après l'ingestion, mais ce sont là les termes extrêmes ; dans la majeure partie des cas, elle a lieu 2 ou 3 jours après.

L'autopsie révèle les phénomènes caractéristiques de la septicémie streptococcique : présence fréquente du sang aux orifices externes des narines, suffusions sanguines sous-cutanées, épanchements sanguinolents dans les cavités, hypertrophie prononcée de la rate, gonflement intense des plaques de Peyer, hémolyse du sang du cœur. Dans les cas où l'autopsie est pratiquée immédiatement après la mort de l'animal, il arrive parfois qu'on ne trouve pas d'hémolyse. Le sang contient toujours des streptocoques.

Nous voyons donc que, en faisant ingérer directement de petites doses du streptocoque aux lapins, la moitié environ meurt après la première ingestion. Si l'on donne de très petites doses ($1/12$, $1/8$, $1/4$ d'une culture), on réussit quelquefois à répéter l'ingestion. Mais la dose d'une culture entière est presque toujours mortelle.

Pour résoudre la question de savoir si l'infection a lieu dans les parties initiales du tube digestif (bouche, pharynx, œsophag) ou dans l'estomac et l'intestin, chez une seconde série de lapins nous avons introduit le streptocoque dans l'estomac, au moyen d'une sonde molle et élastique.

Pour rendre l'expérience plus probante, — et aussi d'après des considérations d'un autre ordre en rapport avec notre but primitif, — nous introduisions par la sonde des doses beaucoup plus considérables, à savoir, de 1 à 60 cultures en une seule fois.

Le résultat des expériences, faites sur 55 lapins, fut le suivant :

Sur 15 lap. ay. reçus 1 ingest., 11 sont morts du strep., 4 de causes étrangères.							
— 16 —	—	2	—	6	—	—	5
— 9 —	—	3	—	5	—	—	4
— 6 —	—	4	—	5	—	—	1
— 4 —	—	5	—	0	—	—	4
— 3 —	—	7	—	3	—	—	0
— 5 —	—	8	—	3	—	—	0
<hr/> 55		<hr/> 33		<hr/> 42		<hr/> 10	

En exprimant ces résultats sous une autre forme, nous trouvons sur un total de 55 lapins traités :

Morts du streptocoque.	après 1 ingestion	20 0/0
	— 2 ingestions.....	41 0/0
	— 3 —	9 0/0
	— 4 —	9 0/0
	— 7 —	5 1/2 0/0
	— 8 —	5 1/2 0/0
Morts de causes étrangères.....		22 0/0
Ont survécu		18 0/0

Si nous cherchons le rapport du nombre total des morts causées par le streptocoque (33) avec le nombre total des ingestions séparées (164), nous trouvons que le pourcentage de la mortalité, par introduction au moyen de la sonde, est égal à 20 0/0.

En comparant maintenant les résultats obtenus avec l'ingestion directe à ceux qu'on obtient avec l'introduction par la sonde, nous voyons que dans ce second cas, malgré la grande différence des doses, la mortalité par infection streptococcique a diminué de plus de deux fois. Or, ce seul fait montre déjà que les points préférés de l'infection doivent se trouver entre la bouche et l'estomac. Nous devons remarquer ensuite qu'il est excessivement difficile de retirer la sonde, après l'introduction des microbes, sans qu'elle ne souille pas son chemin. Si proprement que soit faite cette opération, même en lavant la sonde, après l'introduction des cultures, avec de l'eau stérilisée ou de la solution physiologique, on peut toujours soupçonner que son extrémité sera contaminée. Avec une certaine habitude, nous pouvions prédire, presque à coup sûr, la mort de tel ou tel lapin, parce que l'opération n'avait pas eu lieu avec la perfection voulue. En revanche, si l'opération s'était bien passée, l'animal survivait presque toujours.

C'est cette difficulté d'éviter les régurgitations et les souillures qui explique probablement ce pourcentage de mortalité

qu'on constate dans l'introduction du streptocoque par la sonde.

Quant au processus de pénétration des microbes dans les tissus et les sucs de l'organisme, deux voies sont possibles, et il est probable qu'elles sont utilisées toutes les deux.

Etant donnée la sensibilité du lapin envers le streptocoque, il suffit déjà de lésions minimes de la muqueuse de la bouche, du pharynx ou de l'œsophage, pour que le microbe pénètre dans la circulation générale et cause la mort de l'animal.

En outre de ces lésions de la muqueuse, le streptocoque peut encore utiliser comme voies de pénétration les ouvertures naturelles de la cavité bucco-pharyngienne, et en premier lieu les amygdales. Ces dernières sont peu développées chez le lapin.

Quant à la possibilité de pénétration du streptocoque à travers la muqueuse de l'intestin, il faut ici distinguer aussi 2 cas : la possibilité du passage par les lésions microscopiques qui peuvent se trouver sur la muqueuse, et le passage à travers la muqueuse intacte. Etant donné que, dans le grand nombre d'ingestions du streptocoque que nous avons rapportées, le nombre des animaux infectés est inférieur à la moitié, nous pouvons supposer, avec une forte probabilité, que la muqueuse intacte de l'intestin est impénétrable pour le streptocoque. Quant à la pénétration par les lésions, quoiqu'elle soit très difficile et presque impossible à prouver, on peut l'admettre *a priori*.

En tout cas, le streptocoque introduit ne périt pas dans l'estomac, mais pénètre aussi dans l'intestin. Nous en donnons comme preuve tant les nombreux enseignements du contenu intestinal que l'examen microscopique des coupes de l'intestin avec son contenu.

Disons à ce propos que sur ces coupes d'intestin de différents animaux, intestins prélevés à des moments différents après l'introduction du streptocoque, nous n'avons jamais réussi à observer le streptocoque dans les parois intestinales, bien qu'il se trouve parfois en très grande quantité sur la surface de l'épithélium.

Passons maintenant à l'ingestion des cultures chauffées du streptocoque.

Ici nous n'avons pas employé la sonde, mais nous faisions ingérer le microbe directement de la seringue.

En même temps que nous étudions l'effet de l'ingestion des

cultures chauffées du streptocoque sur les lapins, nous avions toujours en vue notre but primitif, à savoir, l'influence de l'ingestion sur les propriétés du sang.

Nous voulions également rechercher si les animaux acquerraient ainsi l'immunité. Nous avons donc décidé de commencer nos expériences par l'ingestion de cultures chauffées d'abord à 60°, puis à 55°, 50°, 45°, et enfin en tentant l'expérience avec les cultures ordinaires.

La méthode restait la même que dans le cas du streptocoque vivant : l'émulsion streptococcique chauffée pendant 1 heure à 60° était donnée aux lapins à des intervalles de 2 à 7 jours, aux doses de 6 à 20 cultures.

Sur 7 lapins (1^{re} série) qui subirent cette opération 6 à 8 fois, un seul mourut d'une cause étrangère, les 6 autres survécurent ayant supporté les ingestions sans aucun inconvenient.

Dans la suite nous avons fait ingérer à ces mêmes lapins les cultures chauffées à 55° ou 50° ; les intervalles entre les ingestions étaient de 7 à 10 jours. Les doses ingérées variaient entre 3 et 25 cultures. Tous les lapins ont supporté sans dommage 5 ou 7 de ces ingestions.

De 10 lapins neufs (2^e série) qui, *ceteris paribus*, avaient aussi des cultures chauffées à 55° et 50°, 4 seulement ont survécu, 4 sont morts de causes étrangères et les 2 derniers de septicémie streptococcique.

Enfin nous passâmes à l'ingestion des cultures chauffées à 45°. Quoique les doses introduites aient été ici en général beaucoup plus petites : 1 à 4 cultures, les résultats obtenus furent beaucoup moins satisfaisants.

Des 6 lapins de la première série, qui ont commencé par les cultures chauffées à 60°, puis à 55°-50°, 4 sont morts du streptocoque directement après une première ingestion, 1 après 3 ingestions de 2 cultures chacune ; un seul a supporté 5 ingestions de 2 cultures.

Des 4 lapins restés de la 2^e série, c'est-à-dire ayant commencé par les cultures chauffées à 55° ou 50°, tous les 4 sont morts de streptococcie après une ingestion de 3 à 18 cultures chauffées à 45°.

Sur 12 lapins neufs pris pour les mêmes expériences, 10 ont succombé après la première ingestion, dont 7 du streptocoque

et 3 de causes étrangères, les 2 derniers ont survécu après avoir reçu de 4 à 6 fois 1 ou 2 cultures chaque fois.

Ainsi, nous voyons que l'ingestion du streptocoque chauffé pendant une heure à 60° est supportée par les lapins sans aucun danger ; avec les cultures chauffées à 55° ou 50° on trouve quelques cas de mortalité par streptocoque ; enfin, le streptocoque chauffé à 45° ne diffère guère du streptocoque ordinaire.

Le dernier produit que nous avons fait ingérer aux lapins était l'hémolysine streptococcique. Nous la préparions d'après la méthode indiquée par le Dr Besredka. Un mélange à parties égales de bouillon, et de sérum de cheval préalablement chauffé pendant une demi-heure à 36°, étaitensemencé avec le sang d'un lapin venant de succomber de la septicémie streptococcique et contenant par conséquent des streptocoques. Après un séjour de 20 à 24 heures dans l'étuve à 37°, ce mélange était filtré à travers la bougie de Berckfeld, et le liquide filtré contenant l'hémolysine streptococcique était donné aux lapins.

Il va sans dire que nous faisions l'épreuve préalable de la propriété hémolytique de chaque nouvelle streptocolysine ainsi préparée.

L'ingestion se faisait directement de la seringue, dans des intervalles de 5 à 10 jours, et chaque fois nous donnions de 6 à 30 c. c. du liquide. L'ingestion par les différents lapins était répétée de 2 à 7 fois.

Sur 13 lapins, 6 ont supporté l'ingestion sans inconvénient. Quelques-uns ont reçu au total environ 120 c. c. du liquide. 7 autres maigriront et finalement moururent en partie d'une maladie intercurrente, en partie de causes inconnues.

Maintenant, passons à ce qui était notre tâche primitive ; elle consistait à regarder si l'ingestion du streptocoque et de ses produits avait une influence sur les propriétés du sang, si elle augmentait ou affaiblissait sa résistance vis-à-vis de la streptocolysine.

Nous procédions de la façon suivante :

Sur les lapins dont il est parlé plus haut auxquels on avait fait avaler, dans des espaces de temps différents, des doses variées du streptocoque normal, chauffé, et de l'hémolysine streptococcique, on prélevait du sang 7, 9, 10 ou 12 jours après la dernière ingestion. Le sang était désfibriné et éprouvé vis-à-vis de

la streptocolysine fraîche, préparée comme il est dit plus haut.

Nous introduisions ce sang désibriné dans 6 tubes à essai à raison de 1/10 de c. c. par tube. Puis nous ajoutions de la streptocolysine diluée dans de l'eau physiologique de façon que le premier tube contint 1/500 de c. c. de streptocolysine, le second 1/200 de c. c., le troisième 1/100 de c. c., puis 1/50, 1/20 et enfin 1/10 de c. c.

La quantité totale de liquide dans chacun de ces tubes à essai était complétée avec de l'eau physiologique jusqu'à 5 c. c.

Pour comparaison, nous prenions toujours le sang d'un ou de deux lapins neufs.

Nous préparions pour chaque lapin deux séries de semblables tubes à essai.

La première série était laissée à la température du laboratoire, l'autre était placée pendant une demi-heure dans l'étuve à 37°.

Au bout de cette demi-heure, les tubes à essai étaient agités et un certain temps après (1/2 ou 1 h.) étaient comparés entre eux. Quelquefois nous fûmes obligé d'agiter encore une fois, 1 heure ou 1 h. 1/2 après le commencement de l'expérience.

Ayant ainsi procédé nous avons examiné le sang de 2 lapins qui ont reçu par la sonde le streptocoque normal.

L'un d'eux a reçu au total 139 cultures (en 8 fois), l'autre 154 cultures (en 8 fois également).

Chez tous les deux, le sang était prélevé 10 jours après la dernière ingestion.

La comparaison du sang normal avec le sang des animaux traités montre que les globules rouges de ces derniers résistent un peu mieux à l'action de la streptocolysine que les globules des premiers.

Nous avons examiné le sang de 3 lapins ayant ingéré le streptocoque chauffé à 45° (7, 9 et 11 cultures en 4, 5 et 6 fois), de 9 ayant reçu le streptocoque chauffé à 50° ou 55° (de 66 à 103 cultures en 5 ou 6 fois) et de 3 ayant reçu le streptocoque chauffé à 60° (80, 94 et 107 cultures en 8 fois).

Le sang était prélevé 7, 9, 10 ou 12 jours après la dernière ingestion.

Le sang de ces 15 lapins ayant reçu le streptocoque chauffé montra en comparaison avec le sang normal la même différence que le sang des 2 premiers lapins. Cette différence était même ici plus prononcée, sans être toutefois très forte.

Elle était plus fréquente et plus nette dans les tubes contenant 1/200 de c. c. et 1/100 de c. c. de l'hémolysine. Les tubes qui contenaient 1/500 de lysine ne donnèrent jamais de dissolution avec aucune espèce de sang. Dans les tubes à essai contenant 1/50 de c. c., 1/20 et 1/10 de c. c. de la lysine, surtout dans les 2 derniers, la dissolution se produisait dans tous les cas, c'est-à-dire aussi bien avec le sang d'un animal neuf qu'avec le sang des lapins traités.

La différence entre les tubes à essai à la température de laboratoire et les tubes à la température de l'étuve consistait seulement en ceci que pour les premiers la durée de l'expérience était plus longue : tandis que dans les tubes à essai ayant été une demi-heure à l'étuve la différence de réaction se manifestait déjà après 2 ou 3 heures, dans la première série cette différence mettait très souvent plus de 12 heures à se montrer.

Nous avons aussi examiné le sang des lapins ayant avalé de l'hémolysine. Quatre d'entre eux, ayant reçu au total de 40 à 130 c. c. du liquide (en 2, 3 et 6 fois), fournirent un sang qui n'a présenté aucune différence avec le sang de lapin normal.

Il nous reste à présent à répondre à la dernière question : les animaux à qui l'on fait avaler pendant un temps assez long le streptocoque et ses produits acquièrent-ils l'immunité active?

Dans le grand nombre des lapins qui ont servi à nos expériences, quelques-uns restèrent en observation durant 6 mois, recevant pendant le premier mois le streptocoque chauffé à 60°, et dans la suite, pendant 2 mois environ le streptocoque chauffé à 55° ou 50°, puis pendant 1 mois de petites doses du streptocoque chauffé à 45°, et enfin pendant 1 mois et demi du streptocoque ordinaire (par la sonde) en grande quantité.

Or, les lapins traités comme nous venons de le dire ou à peu près, moururent tout d'un coup après une seule introduction du streptocoque par la sonde ou même après une ingestion du streptocoque chauffé à 45°.

Ces faits et d'autres semblables montrent qu'il n'est guère possible de parler ici d'une immunité acquise,

Si donc nous résumons maintenant tout ce que nous avons dit plus haut, nous arrivons aux conclusions suivantes :

L'administration *per os* de petites doses du streptocoque vivant aux lapins amène presque dans la moitié des cas la mort de ces derniers avec les symptômes de la septicémie streptococcique.

Si l'on introduit les mêmes streptocoques directement dans l'estomac (par la sonde), la mortalité diminue de plus de moitié.

L'ingestion des cultures chauffées pendant 1 heure à 45° ne diffère en rien par ses résultats de l'administration des cultures non chauffées.

Si l'on fait ingérer des streptocoques chauffés à 50° ou 55°, la mortalité baisse encore; enfin les cultures chauffées à 60° ne provoquent en aucun cas la mort.

Nous considérons que dans tous ces cas l'infection a lieu d'une façon générale, sinon exclusivement, par les premières parties des voies digestives, c'est-à-dire dans la bouche, le pharynx et l'œsophage.

Selon toute probabilité, ce sont les lésions microscopiques de la muqueuse et peut-être des ouvertures naturelles (comme celles des amygdales) qui servent au microbe de voies de pénétration.

La muqueuse intacte de l'intestin n'est pas pénétrable pour le streptocoque.

Si l'on admet la possibilité de l'infection à travers l'intestin, elle doit avoir lieu par des lésions accidentelles.

L'administration *per os* de l'hémolysine streptococcique paraît être tout à fait inoffensive pour les lapins.

Les globules rouges du sang des lapins qui ont ingéré des streptocoques sont un peu plus résistants que ceux des lapins neufs, à l'action de l'hémolysine streptococcique.

Le sang des lapins ayant reçu de la streptocolysine ne montre aucune différence avec le sang normal.

Les animaux qui ingèrent même pendant un temps assez long des streptocoques, d'abord chauffés puis non chauffés, n'acquièrent aucune immunité active contre le microbe.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1905

PAR M. JULES VIALA
Préparateur au service de la rage.

Pendant l'année 1905, 728 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur. Parmi les 728 personnes traitées, 4 sont mortes de rage. Chez une d'entre elles, la rage s'est déclarée avant la fin du traitement; cette personne ne sera pas comptée parmi les personnes traitées. La mortalité totale a donc été de 0,54 0/0.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	727
Morts.....	3
Mortalité.....	0,41 0/0

Le nombre des personnes traitées se rapproche de celui de l'année dernière (755).

Depuis la création d'Instituts antirabiques à Lyon, Marseille, Bordeaux, Lille et Montpellier, un certain nombre de personnes mordues y vont demander des soins au lieu de venir à Paris.

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité.
1886.....	2.671	25	0,94 0/0
1887.....	1.770	14	0,79 —
1888.....	1.622	9	0,55 —
1889.....	1.830	7	0,38 —
1890.....	1.540	6	0,32 —
1891.....	1.559	4	0,25 —
1892.....	1.790	4	0,22 —
1893.....	1.648	6	0,36 —
1894.....	1.387	7	0,50 —
1895.....	1.520	5	0,33 —
1896.....	1.308	4	0,30 —
1897.....	1.521	6	0,39 —
1898.....	1.465	3	0,20 —
1899.....	1.614	4	0,25 —
1900.....	1.420	4	0,35 —
1901.....	1.321	6	0,38 —
1902.....	1.405	2	0,48 —
1903.....	628	2	0,32 —
1904.....	755	3	0,39 —
1905.....	727	3	0,41 —

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. La rage de l'animal mordeur a été expérimenta-

lement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. Personnes pour lesquelles la rage de l'animal mordeur est constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. Personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1905 :

	MORSURES à la tête et aux mains.			MORSURES aux mains.			MORSURES aux membres et au tronc.			TOTALS		
	Personnes traitées	Morts.	Mortalité.	Personnes traitées	Morts.	Mortalité.	Personnes traitées	Morts.	Mortalité.	Personnes traitées	Morts.	Mortalité.
Tableau A.	9	0	0	103	0	0	54	0	0	166	0	0
Tableau B.	22	0	0	179	1	0,55	105	1	0,95	306	2	0,65
Tableau C.	12	0	0	124	1	0,80	119	0	0	255	1	0,39
	43	0	0	406	2	»	278	1	»	727	3	0,41

Au point de vue de leur nationalité, les 727 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre	4
Hollande	1
Belgique	1

Soit 721 Français et 6 étrangers.

Voici la répartition par département des 721 Français :

Aisne.....	8	Loire-Inférieure.....	10	Saône (Haute-).....	20
Allier.....	9	Loiret.....	10	Sarthe.....	5
Aveyron.....	3	Loir-et-Cher.....	7	Savoie.....	2
Cantal.....	7	Lot.....	11	Sèvres (Deux-).....	8
Cher.....	11	Lot-et-Garonne.....	2	Seine.....	236
Charente.....	2	Lozère.....	2	Seine-et-Marne.....	4
Côte-d'Or.....	12	Maine-et-Loire.....	7	Scine-Inférieure.....	4
Côtes-du-Nord.....	54	Manche.....	8	Seinc-et-Oise.....	22
Corrèze.....	7	Marne.....	3	Somme.....	4
Creuse.....	18	Marne (Haute-).....	9	Tarn-et-Garonne.....	8
Doubs.....	3	Mayenne.....	3	Vaucluse.....	2
Eure-et-Loir.....	2	Meurthe.....	4	Vendée.....	11
Finistère.....	41	Morbihan.....	32	Vienne.....	10
Gers.....	2	Nièvre.....	9	Vienne (Haute-).....	9
Ille-et-Vilaine.....	27	Oise.....	8	Vosges.....	40
Indre.....	12	Rhône.....	7		
Indre-et-Loire.....	6	Saône-et-Loire.....	4		

Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que cinq Instituts antirabiques fonctionnent en France.

Personnes prises de rage en cours de traitement.

Maria Lemaitre, 5 ans, demeurant à Pleneuf (Côtes-du-Nord). Mordue le 13 octobre, au nez. Trois morsures qui ont saigné. Ces morsures n'ont pas été cautérisées. Mordue par un chien reconnu suspect de rage par M. Huon, vétérinaire à Lamballe.

Les animaux inoculés le 19 octobre avec le bulbe de ce chien ont été pris de rage le 8 novembre.

Maria Lemaitre a commencé le traitement le 23 octobre et a été prise de rage le 2 novembre.

Morte à l'hôpital Pasteur le 4 novembre.

Personnes traitées mortes de rage après le traitement.

Brisson Anne, née Basot demeurant à Saint-Médard (Creuse). Mordue le 8 avril à la main gauche, face dorsale, deux morsures profondes, au mollet gauche, deux morsures pénétrantes qui ont saigné beaucoup et qui ont été cautérisées au thermocautère.

Mordue par un chien reconnu enragé par M. Allethière, vétérinaire sanitaire.

M^{me} Brisson a été traitée à l'Institut Pasteur du 9 au 25 avril. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 24 juin. Meurt le 26 juin.

Antoine Alphonse, 29 ans, maréchal-ferrant, demeurant au Val d'Ajol (Vosges).

Mordu le 18 juillet à l'index gauche. 4 morsures qui ont saigné. Ces morsures n'ont pas été cautérisées.

Mordu par un chat qui a été reconnu enragé par M. Wauvray, vétérinaire. Antoine a été traité à l'Institut Pasteur du 22 juillet au 6 août.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 6 septembre. Il meurt de rage le 8 septembre.

Antoine était alcoolique.

Une autre personne mordue par le même chat et traitée à l'Institut Pasteur se porte bien.

Eugène Cadre, 7 ans, de Tréderez (Côtes-du-Nord).

Mordu le 24 décembre à l'auriculaire droit, une morsure pénétrante non cautérisée.

Traité du 31 décembre au 17 janvier. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 26 avril. Il meurt le 3 mai.

Cadre avait été mordu par un chien qui n'a pas été retrouvé.

Le même animal a mordu trois autres personnes qui ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur et qui se portent bien.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charante.